

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv cyklosporinu A na aktivaci prasečího oocytu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Daniela Tupá

Vedoucí práce: Ing. Lenka Tomšová, Ph.D.

© 2015 ZU v Praze

Prohlášení

Prohláuji, že svou diplomovou práci "Vliv cyklosporinu A na aktivaci prasečího oocytu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informacích zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 9. 4. 2015

Pod kování

Ráda bych touto cestou podkovala Ing. Lence Třembořové, PhD. za poskytnuté materiály, velkou trpělivost, spousty cenných rad a připomínek při psaní diplomové práce. Také bych ráda podkovala mamince a celé mojí rodině za podporu během celého mého studia.

Vliv cyklosporinu A na aktivaci prase ího oocytu

Souhrn

Aktivace oocyt je složitý děj, který zahrnuje prolomení druhého meiotického bloku, kortikální reakci, dokončení druhého meiotického dělení a vydělení druhého pólového tělíška. Aktivace je regulována celou řadou faktorů, z nichž mnohé nejsou dosud objasněny.

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující aktivaci oocytu je vzestup hladiny intracelulárního vápníku a následné oscilace. Oscilace vápníkových iontů v oocytu jsou vyvolány penetrující spermii, která vnáší do oocytu pro spermii specifický faktor fosfolipázu C izoformu zeta (PLC ζ). PLC ζ hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP₂), následkem toho vzniká inositoltrifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG), IP₃ mobilizuje intracelulární Ca²⁺. Ten následně aktivuje kalmodulin dependentní kinázu II (CaMKII). Mezi proteiny závislé na hladině vápníku a kalmodulinu patří i serin/treonin protein fosfatáza 2B neboli calcineurin. Ten se skládá z katalytické podjednotky A a z regulační podjednotky B. Role calcineurinu při aktivaci oocytu byla prokázána u bezobratlých a níže obratlovců. U savců byla jeho přítomnost zaznamenána v rostoucích a zrajících oocytech prasete. Lze předpokládat, že je calcineurin zapojen i v regulaci procesů spojených s aktivací oocytu prasete.

Cílem práce bylo zjistit, zda se calcineurin podílí na aktivaci prasečích oocytů. Hypotéza byla ověřována pomocí inhibice calcineurinu cyklosporinem A během aktivace oocytu prasete. Nejprve však byla ověřena přítomnost obou podjednotek calcineurinu pomocí nepřímé imunofluorescence v oocytech ve stádiu MII a v partenogeneticky aktivovaných oocytech. Podjednotky calcineurinu A i B byly lokalizovány zejména v korové oblasti zralých i aktivovaných oocytů. Ve druhém experimentu byly zralé oocyty ošetřeny cyklosporinem A a následně partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A 23187. U této skupiny oocytů bylo zaznamenáno signifikantní snížení aktivace na 23,5 %, na rozdíl od kontrolní skupiny oocytů ošetřených pouze kalcium ionoforem s mírou aktivace přesahující 80 %. Na základě výsledků se lze domnívat, že je protein calcineurin zapojen do procesu aktivace savčího oocytu.

Klíčová slova: oocyt, aktivace, calcineurin, cyklosporin, prase

The effect of cyclosporine A on porcine oocyte activation

Summary

Activation of oocytes is a complex process which includes the exit from the second meiotic arrest, the cortical reaction, the second meiotic division completion and the second polar body extrusion. The activation is regulated by a number of factors and many of them have not been elucidated yet.

One of the most important factors affecting the activation of oocyte is the rise of Ca^{2+} . In oocyte, Ca^{2+} oscillations are triggered by a sperm-specific factor phospholipase C, PLC. Phospholipase C hydrolyzes phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) and this leads to formation of IP₃ and diacylglycerol (DAG). IP₃ mobilizes intracellular calcium. Ca^{2+} then activates calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII). One of the proteins dependent on the level of calcium and calmodulin is Ser/Thr protein phosphatase 2B, so-called calcineurin. This consists of the catalytic subunit A and the regulatory subunit B. The role of calcineurin in oocyte activation has been shown in invertebrates and lower vertebrates. In mammals its presence has been reported in growing and maturing pig oocytes. It can be assumed that calcineurin is involved in regulation of processes associated with activation of porcine oocytes too.

The aim of this master's work was to investigate whether calcineurin participates in porcine oocyte activation. The hypothesis was tested using calcineurin inhibition with cyclosporin A during the oocyte activation. First, however, the presence of both calcineurin subunits was verified using indirect immunofluorescence in MII oocytes and parthenogenetically activated oocytes. The calcineurin subunits A and B were localized especially within the cortex in matured and activated oocytes. In the second experiment, matured oocytes were treated with cyclosporin A and then parthenogenetically activated with calcium ionophore A 23187. In this group of oocytes a significant decrease of activation to 23,5 %, in contrast to the control group treated only with calcium ionophore with an activation rate over 80 %. Based on these results it can be assumed that the protein calcineurin is involved in the activation process of mammalian oocyte.

Keywords: oocyte, activation, calcineurin, cyclosporine, porcine

Obsah

1 Úvod	1
2 V dečná hypotéza a cíle práce	2
3 Literární re-er-e	3
3.1 Oogeneze	3
3.1.1 PGC.....	3
3.1.2 R st oocytu.....	5
3.1.3 Zrání oocytu	8
3.2 Aktivace oocytu	9
3.2.1 Fertilizace	9
3.2.2 Partenogenetická aktivace.....	11
3.2.3 Vybrané faktory ovliv ující aktivaci	12
3.2.3.1 Vápník	12
3.2.3.2 MPF.....	15
3.2.3.3 MAP-kináza	16
3.2.3.4 Kalcium/kalmodulin dependentní kináza II.....	18
3.2.3.5 Cyklický adenosin monofosfát (cAMP).....	18
3.2.3.6 Gasotransmitery	20
3.2.3.7 Mos-protein a CSF	22
3.3 Kalcineurin	23
3.3.1 Chemické složení a regulace aktivity	23
3.3.2 Inhibitory.....	26
3.3.3 Fyziologická funkce v organismu	27
3.3.4 Fyziologická funkce v reprodukci.....	28
4 Materiál a metody	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Získávání vaje ník	31
4.1.2 Získávání oocyt	31
4.1.3 Kultiva ní média pro <i>in vitro</i> zrání.....	31
4.2 Metody	32
4.2.1 <i>In vitro</i> kultivace oocyt	32
4.2.2 Partenogenetická aktivace zralých oocyt	32
4.2.3 O-et ení oocyt inhibítorem kalcinuerinu.....	32

4.2.4	Barvení oocyt pro lokalizaci jednotlivých izoform kalcineurinu	33
4.2.5	Vyhodnocení experiment	33
4.3	Experimentální schéma	34
4.3.1	Experiment 1	34
4.3.2	Experiment 2	35
5	Výsledky	37
5.1	Experiment 1: Lokalizace kalcineurinu v <i>in vitro</i> zralých a partenogeneticky aktivovaných oocytech.....	37
5.2	Experiment 2: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivaci praseích oocyt	39
6	Diskuze	40
7	Závěr	42
8	Seznam literatury.....	43
9	Seznam použitých zkratk a symbol	52
10	Seznam obrázk	54
11	Seznam tabulek.....	55

1 Úvod

S pokrokem v dy vzrostl význam reproduk níh biotechnologií, a to nejen v chovech hospodá ských zví at, ale p edev-ím v humánní oblasti. Je v-eobecn známo, fle se lidská populace stále více potýká s problémy v oblasti p irozeného rozmnofování. Pro zdokonalení biotechnologických metod, je nutné, co nejlépe porozum t reproduk nímu pochod m v etn procesu vývoje gamet. Vývoj sami íh gamet, oocyt , za íná jifl v prenatálním období vznikem a množením zárode ných bun k, z nichfl pozd ji vzniknou oocyty, pokrač uje fází r stu t chto oocyt , fází meiotického zrání a aktivací oocyt . Proces aktivace, p i kterém oocyt dokon í sv j vývoj, je v p irozených podmínkách vyvolán penetrací spermie do oocytu. V *in vitro* podmínkách lze aktivaci navodit téfl pomocí um lých stimul . Klí ovým problémem je v-ak neúplná znalost mechanism regulujících proces aktivace oocytu. Významnou úlohu v regulaci tohoto d je sehrávají i r zné kinázy a fosfatázy. Jednou z nich je pravd podobn í protein fosfatáza 2B neboli kalcineurin.

Úloha kalcineurinu v aktivaci oocytu byla jifl prokázána u mouchy rodu *Drosophila* a fláby rodu *Xenopus*, a to konkrétn p i výstupu oocyt z metafáze II. U savc hraje kalcineurin roli p i ízení meiotického zrání oocyt prasete. Vzhledem k evolu n vysoce konzervativní struktu e kalcineurinu, lze p edpokládat zapojení kalcineurinu i v regulaci proces spojených s aktivací oocytu prasete. Oocyty prasete jsou navíc velice vhodné pro studium biologie gamet, nebo prase je z d vodu genetických, anatomických a fyziologických podobností s lidmi považováno za ideální zví ecí model pro biomedicínský výzkum.

2 Vdecká hypotéza a cíle práce

Na základ dostupných údaj z literatury byla stanovena hypotéza, že je protein fosfatáza 2B, kalcineurin, zapojena do aktivace oocytu prasete.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny následující cíle:

- lokalizovat kalcineurin ve zralých a partenogeneticky aktivovaných oocytech prasete
- inhibovat kalcineurin pomocí cyklosporinu A během aktivace oocytu prasete.

3 Literární re-er-e

3.1 Oogeneze

Oogeneze u savc zahrnuje komplexní adu morfogenetických zm n, které probíhají v ovariálním folikulu. Bu ky v dominantním folikulu mají dv hlavní funkce, steroidogenezi a oogenezi (Coticchio *et al.*, 2013). Oogeneze za íná formováním primordiálních zárode ných bun k, zahrnuje sérii bun ných p em n z primordiální zárode né bu ky v oogonii, z oogonie v oocyt a z oocytu ve vají ko (Wassarman, 1988). Oogenezi je mofno rozdlit do t í fází: fázi mnofení zárode ných bun k, z nichfl pozd ji vzniknou oocyty, fázi r stu t chto oocyt a fázi meiotického zrání oocyt . Meiotické zrání oocyt je proces p í kterém vzniká pohlavní bu ka s haploidním po tem chromozom (Jílek *et al.*, 2002). Pouze u meiózy dochází k rekombinaci homologních chromozom a k vým n genetické informace prost ednictvím chiasmat (Jones, 2005).

3.1.1 PGC

Primordiální zárode né bu ky (PGCs ó Primordial Germ Cells) jsou schopné se zm nit v oocyty nebo spermie. PGC vznikají v extraembryonální tkáni v proximálním epiblastu (Molyneaux a Wylie, 2004). V jejich diferenciaci hrají d leflitou roli r stové faktory, zejména pak kostní morfogenetické proteiny (BMP, Bone Morfogenetic Proteins), BMP4/BMP8b. PGC jifl na za átku embryonálního vývoje nejsou zcela stejné, to dokazuje i rozdílné chování a odpov k vn j-ím signál m, p edev-ím pak k r stovým faktor m. ást jich pak zodpovídá za expresi gen pro povrchové proteiny fragilis nebo stella, a práv ty jsou považovány za budoucí zárode né bu ky. Mají vysokou mitotickou aktivitu a je-t p ed jejich kone nou lokalizací, tedy v budoucích pohlavních flázách, zvý-í sv j po et z n kolika desítek na n kolik tisíc (Fulka, 2007).

Molyneaux a Wylie (2004) rozdlili migraci PGC u my-í do 6 krok . Krátce po jejich vzniku se za ínají pohybovat k zadní ásti primitivního proufku, afl prolifерují do entodermu a allantoisu. Ve druhém kroku jsou PGC entodermu za len ny do zadního st eva, n které ale z stávají v allantoisu. Ve t étím kroku se trávicí trakt roz-í uje a uzavírá v trubici. PGC jsou v zadním st ev , ale mohou se voln pohybovat okolo epitelových bun k trávicí trubice. Jejich pohyblivost je náhodná a mohou krouffit kolem st eva nebo se p esunují sm rem k p ední i zadní ásti. Ve tvrtém kroku se PGC vyno í ze h betní strany zadního st eva

a migrují směrem k genitálním lištám, které se teprve vyvíjejí. V posledním kroku shluky PGC začíná a tím se migrace buněk zpomaluje. V posledním kroku v tělně PGC kolonizuje genitální lištu. Celý proces trvá u myši přibližně 4 dny. Jakmile PGC osídlí genitální lištu, tak se dle dostupných chromozomů přemění na oogonie nebo spermatogonie, které mají vysokou mitotickou a transkripční aktivitu. Ve vaječnicích se vytvářejí skupiny oogonií, které jsou mezi sebou propojeny cytoplazmatickými mosty, tím se utvářejí shluky. Oogonie podstupují další replikaci DNA, a poté co vstupují do meiózy, se nazývají oocyty. Ty procházejí leptotene, zygotene a pachytene, celý proces se zastavuje v diplotene v profázi I meiotického bloku (Hurk a Zhao, 2005).

Tabulka 1: Faktory ovlivňující vznik primordiálních zárodečných buněk (Hurk a Zhao, 2005)

Faktor	Jeho funkce
BMP-2/-4/-8b	vznik PGC · myš
KL	přelití, migrace, proliferace PGC · myš, proliferace oogonií, iniciace meiózy · primáti
LIF	přelití, proliferace PGC, iniciace meiózy · myš,
FGF-2	proliferace PGC · myš
TNF	proliferace PGC · myš
IL-4	proliferace oogonií · myš
PACAP	proliferace PGC · myš
TGF 1	atrakce PGC · myš
Aktivin	atrakce PGC · myš, přelití a proliferace oogonií · primáti
1-Integrin	kolonizace pohlavních lišt PGC · myš
E-Kadherin	shlukování PGC v pohlavních lištách · myš
NT-4	proliferace oogonií · primáti
IGF-I	iniciace meiózy · myš
Estradiol	formování kortikálních provazců · ovce
NA/VIP	vznik steroid a sexuální oogeneze · potkan
SPO-11	proliferace oogonií a iniciace meiózy · myš
MSH-5	iniciace meiózy · myš
DMC-1	iniciace meiózy · myš
AhR	apoptóza oocyt · myš

Celá desetiletí platilo na poli reprodukční biologie základní dogma, které tvrdilo, že samice savců mají konečný počet primordiálních folikulů. Tedy rezerva oocytů je dána již v prenatálním vývoji jedince. Nedávné experimenty ukazují, že ovariální povrch epitelu a kortikální tkáň, a to jak u myši, tak i u člověka, obsahují velmi nízký podíl buněk schopných množit se, ale i generovat nezralé oocyty *in vitro* nebo *in vivo*. Ty posléze mohou být transplantovány do imunodeficitních myšičích vajec. Půlživci neo-oogeneze uvádí, že za nové obnovitelné zdroje oocytů lze považovat zárodečné kmenové buňky (GSC). Ty se podle nich nacházejí v epitelu ovarií nebo v kostní dřeně, krevním řečištem se dostávají do vajec, kde diferencují v oocyt, granulární tkáň, fibroblastické buňky, *in vitro* podle stimulace v nervový a mezenchymální typ buněk (Gheorghisan-Galateanu *et al.*, 2014). Tilly a Telfer (2009) poukazují na to, že již v roce 2004 byla publikována studie o přítomnosti mitoticky aktivních zárodečných buněk, v ovariích u mladých a dospělých myši. Další poznatky prezentovanými v této studii je možnost zachování schopnosti generovat savčí oocyty i v průběhu dospělosti. Nicméně izolace oocytů produkujících zárodečné linie kmenových buněk (GSC) jako jediná možnost v této studii potvrzena nebyla.

3.1.2 Růst oocytu

Rstová fáze oocytu obsahuje akumulaci změn v organelách, inkluzích a v transkripční aktivitě, které jsou nezbytné pro dosažení meiotické a vývojové kompetence. Během růstu oocytu se mění jeho velikost z méně jak 30 μm v primordiálním folikulu až na velikost 120 μm v terciálním folikulu. Transkripce oocytu je udržována do průměru asi 110 μm . Při průměru 100 až 110 μm postupně získávají jen část meiotickou kompetenci, což je hlavní předpoklad pro úspěšnou aktivaci oocytu a zahájení embryonálního vývoje (Hyttel *et al.*, 1997). Prasečí oocyty s průměrem 120 μm jsou plně meioticky kompetentní a jsou schopny dospět do fáze druhé metafáze meiotického dělení (MII). Rostoucí prasečí oocyty s průměrem 110 μm nejsou schopny dokončit zrání a zůstávají v první metafázi (MI), jsou tedy pouze částečně meioticky kompetentní. Oocyty menší než 100 μm jsou meioticky nekompetentní (Tomová *et al.*, 2013). S tím souvisí i velikost folikulů při aspiraci pro *in vitro* zrání, Abeydeera (2002) uvádí ve své studii, že nejvíce meioticky kompetentních oocytů je získáváno z folikulů 3 až 6 mm velkých.

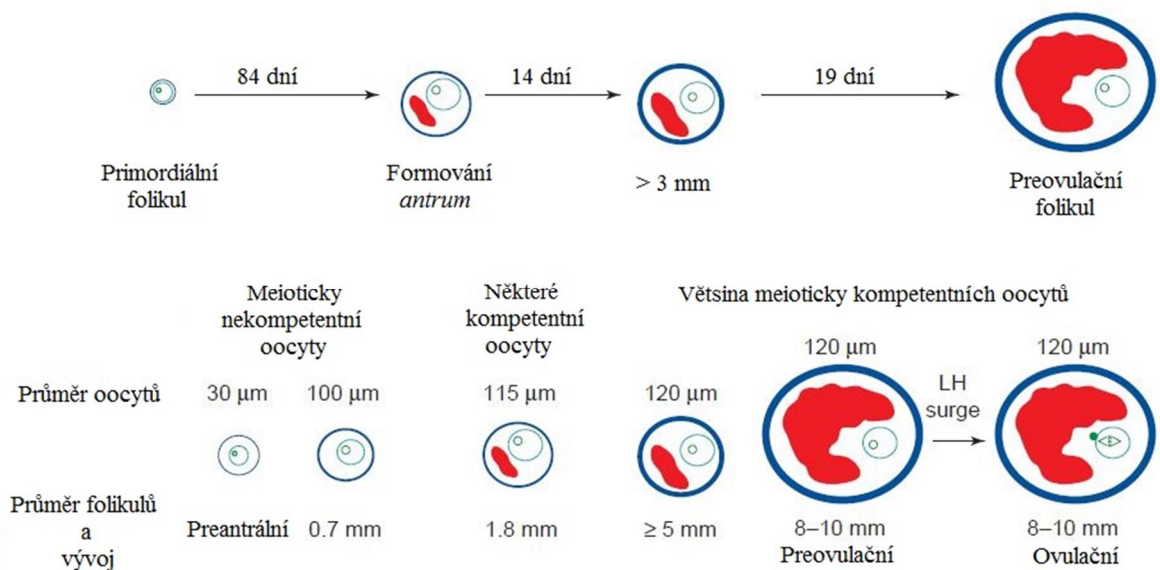
V rostoucích oocytech u skotu, prasat i u myší byly pozorovány vysoké hladiny RNA syntézy. Ty jsou důležitě pro růst, vývoj a zrání oocyty, a pro skladování RNA a bílkovin pro postfertilizační vývoj (Kanitz *et al.*, 2001; Susor *et al.*, 2015). Kumulární buňky jsou během růstu a před dosažením meiotické kompetence (před zahájením meiózy) zodpovědné za udržení fáze zárodečného váčku (GV ógerminal vesicle). A to prostřednictvím udržování mezibuněčné hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v oocytech, přes blokování signálu v gap junction spojích (Somfai *et al.*, 2004).

Ve své studii Hyttel *et al.* (1997) uvádí růst oocyty v závislosti na velikosti folikul u skotu. Primordiální folikuly (velikost $34,6 \pm 3,7 \mu\text{m}$) obsahují oocyty o velikosti $27,9 \pm 3,3 \mu\text{m}$, ty mají jádro, které je světlé a je obklopeno mitochondriemi, hladkým a drsným endoplazmatickým retikulem, malým Golgiho komplexem. To dohromady tvoří tzv. floutkové jádro Balbianiho. Povrch oocyty je tvořen jednou vrstvou zploděných granulárních buněk (Hyttel *et al.*, 1997; Jílek *et al.*, 2002). Primární folikuly ($46,1 \pm 6,1 \mu\text{m}$) obsahují oocyty o velikosti $31,6 \pm 4,3 \mu\text{m}$. Na které mitochondrie jsou prodlouženy o mikrokilky, v blízkosti granul oocyty se vytváří fibrilární centrum jádérka. Na povrchu oocyty se nachází jedna vrstva kubických granulárních buněk (Hyttel *et al.*, 1997). Sekundární folikuly ($101,7 \pm 41,8 \mu\text{m}$) obsahují oocyty o velikosti $45,6 \pm 14,0 \mu\text{m}$. Objevují se malé skvrny na *zona pellucida* a mezi oocytem a granulárními buňkami se vytvářejí gap junction spoje. V oocyty se nachází několik malých kortikálních granul a začínají se objevovat lipidové kapky, Golgiho komplex a hladké endoplazmatické retikulum se zvětšují a postupně přesouvají k periférii ooplazmy. Fibrilární centrum jádérka se zcela začlenilo do obvodu jádérka. Oocyt je obklopen více jak jednou vrstvou granulárních buněk (Hyttel *et al.*, 1997). Brzké terciální folikuly o velikosti 1 mm, ve kterém se začíná vytvářet antrální dutina, obsahují oocyt veliký zhruba $80 \mu\text{m}$. Organely v oocyty jsou rovnoměrně rozloženy, zvýšil se počet a velikost kortikálních granul a lipidových kapek. Oocyt je obklopen kumulárními buňkami, které tvoří vejconosný hrbolek neboli *cumulus oophorus*, jeho nejvnitřnější vrstva se nazývá *corona radiata*, a její buňky mají výstupky, které pronikají do *zona pellucida* a tvoří spoje gap junction. Jáderko je zrnité a má rovnoměrně rozložena fibrilární centra (Hyttel *et al.*, 1997; Jílek *et al.*, 2002). Terciální folikuly do velikosti 3 mm obsahují oocyty 80 až $110 \mu\text{m}$. Počet lipidových kapek se zvyšuje. V oocytech, které jsou menší jak $100 \mu\text{m}$, se granulované jáderko postupně rozvíjí agregací elektronových granulí kolem fibrilárních center (Hyttel *et al.*, 1997). Pozdní terciální folikuly obsahují oocyty větší jak $110 \mu\text{m}$, jejich organely jsou rozmístěné po obvodu. Počet lipidových kapek a váček se

je-t zvý-íl a mají velikost Golgiho aparátu. Mikroklky jsou uvoln ny ze *zona pellucida* a hromadí se ve shlucích v periviteliním prostoru (Hyttel *et al.*, 1997).

V regulaci r stu folikul hrají klí ovou roli hormony uvol ující gonadotropiny (GnRH ó Gonadotropin Releasing Hormones), folikulostimula ní hormon (FSH) a luteiniza ní hormon (LH). GnRH je pulzn uvol ován z hypotalamu, váfle se na GnRH receptory v p ední ásti hypofýzy, kde stimuluje sekreci FSH a LH. Gonadotropiny FSH a LH jsou heterodimerní molekuly obsahující spole nou α -podjednotku a hormonáln specifickou β -podjednotku. Syntéza a sekrece FSH a LH pozitivn nebo negativn reguluje pohlavní hormony. Gonadotropiny FSH a LH se váffí na receptory na folikulárních bu kách a vyvolávají procesy proliferace a diferenciacce. U prasat je zvý-ená koncentrace FSH po ovulaci d leffitá pro rozvoj dal-ích folikul , nejd leffit j-í je ov-em zm na pom ru mezi progesteronem a gonadotropinem LH. Mezi 17. a 19. dnem cyklu poklesne koncentrace FSH a z stává nízká afl do p edovula ní vlny LH. Dominance jednotlivých folikul je u prasat mén výrazná o proti uniparním druh m zví at. Nicmén je prokázáno, fle b hem folikulární fáze estrálního cyklu velké folikuly vytvá ejí funk ní blok ve vývoji ostatních folikul (Kanitz *et al.*, 2001).

Obrázek 1: R st folikulu, prase ího oocytu a získání meiotické kompetence (Hunter, 2000)



3.1.3 Zrání oocytu

Obecně lze rozdělit zrání oocytu na zrání jaderné a cytoplazmatické. Jaderné se používá ve vztahu k meióze. Cytoplazmatické zrání je širší pojem, je-li se vztahuje k událostem, které nejsou v přímém vztahu k meióze. Nicméně i tyto události jsou důležité pro přípravu oocytu k oplození (Abeydeera, 2002).

Meióza začíná u člověka embryonálního vývoje, ale je zablokována ve fázi diplotene. V oocytech, které jsou plně dospělé, pokračuje meióza rozpadem zárodečného váku, přes metafázi I, anafázi I, telofázi I až do metafáze II, kde nastává druhý meiotický blok (Sedmíková *et al.*, 2003).

Zrání oocytů závisí na komunikaci mezi folikulárními buňkami a oocytem, také na procesech ve folikulárních buňkách, které jsou pod řízením gonadotropinů. Důležitý je vztah mezi folikulárním průměrem a vazebnou kapacitou pro LH/hCG (luteinizační hormon/Human chorionic gonadotropin, lidský choriový gonadotropin). Oocyty jsou zastaveny v profázi I, tedy ve fázi GV, aby tento blok překonaly je potřeba hormonální stimulace ve folikulu, nebo jejich vyjmutí a zrání *in vitro* (IVM *ó in vitro maturation*) (Kanitz *et al.*, 2001).

Aktivita a organizace mitochondrií jsou jedním z početných faktorů zapojených do cytoplazmatického zrání. Primární funkcí mitochondrií je vytváření ATP, který je důležitý pro zachování homeostázy a regulaci prostředí oocytů (Brevini *et al.*, 2005). Důležitou úlohu také hraje cAMP, který při znovuzahájení meiózy klesá, což může být zapříčiněno zvýšenou koncentrací LH. Nicméně, snížení koncentrace cAMP není jedinou příčinou zrání oocytu, dále se do ní zapojuje MPF (Metaphase promoting Faktor). V oocytech prasat je MPF aktivita ve fázi GV nízká a zvyšuje se během GVBD (germinal vesicle breakdown), a zůstává vysoká v metafázi I a metafázi II. Proces zrání se vyznačuje vlnitým a pak rozpadem jaderné membrány, který nastává po 24 hodinách v prasečích oocytech v IVM. V průběhu zrání se tyto mitochondrii snižují. Kortikální granula pocházející z Golgiho komplexu, se přesunují do periférií oocytu. Při GVBD dochází k kondenzaci chromatinu a tvorbě dýchacího řetězce, dále je proces doprovázen rozsáhlou defosforylací cytoplazmatických proteinů. Mitogen aktivující protein kináza (MAPK) spolu s cdc2 kinázou (Cyclin-dependent kinase) jsou dvě hlavními kinázami, které jsou zapojeny do tohoto procesu. U cdc2 kinázy se předpokládá, že je zodpovědná za GVBD fázi a kondenzaci chromozomů, což prokazuje i skutečnost, že pokud je cdc2 kináza inhibována v GV fázi, tak je zabráněno zrání. Dále při GVBD dochází k silnému nárůstu syntézy bílkovin, což koreluje s aktivací MAPK kinázy

a fosforylací translačních iniciálních faktorů. V této fázi také dochází k regulaci genové exprese lze tedy říci, že v oocytech běží pouze translace (Kanitz *et al.*, 2001).

Kumulární buňky hrají důležitou úlohu při zrání oocytů, protože poskytují a přenesí několik známých, ale i neznámých faktorů, které jsou nezbytné pro normální jaderné a cytoplazmatické zrání oocytů, a následný embryonální vývoj po fertilizaci (Somfai *et al.*, 2004). Do určité míry mohou kumulární buňky sloužit jako indikátor úspěšného jaderného a cytoplazmatického zrání. U většiny savců jsou kumulární buňky v ovulacím oocytech expandované. U myši je převažující složkou v expandovaném kumulárním kyselinou hyaluronovou, její množství úzce koreluje se stupněm expanze (Abeydeera, 2002).

Úspěšného zrání prasečích oocytů v podmínkách *in vitro* lze dosáhnout v různých typech kultivačních médiích. Ať už jednoduchých médiích nebo v komplexních, obsahujících bovinní sérový albumin (FCS), nebo folikulární tekutiny (FF) a spousty dalších látek jako jsou například gonadotropiny a růstové faktory (Abeydeera, 2002).

3.2 Aktivace oocytů

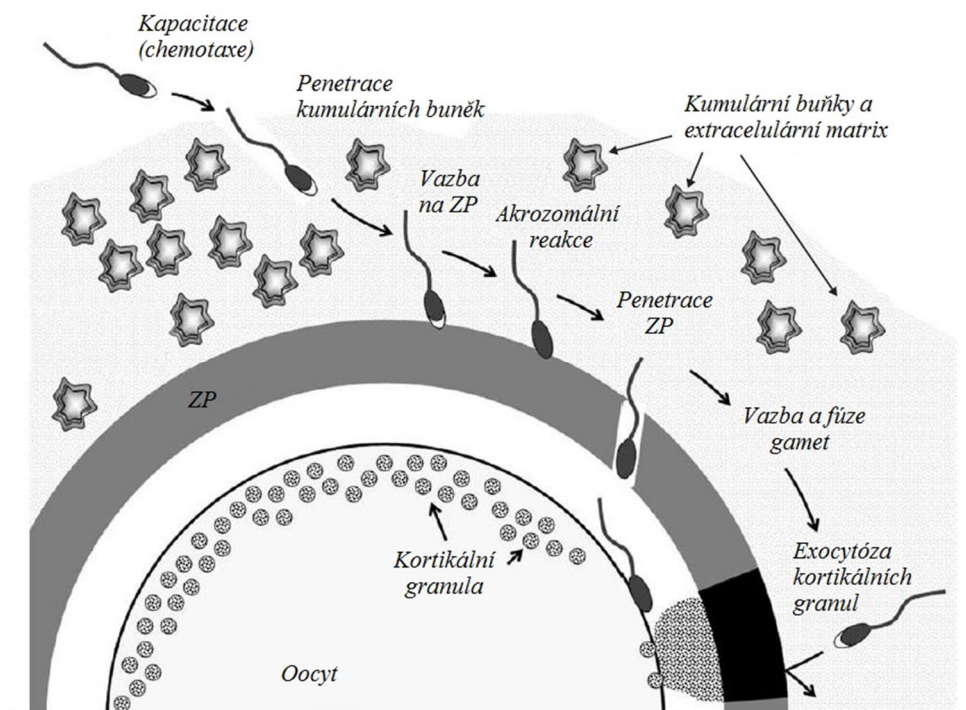
Savčí oocyty, kromě oocytů psovitých, jsou v době ovulace zablokovány v MII fázi a dokončí meiózu až po oplození. Vápník, MPF a jeho stabilizační molekuly hrají rozhodující úlohu při aktivaci. Pro oocyt v MII bloku je typická vysoká hladina MPF, heterodimer cdc2 a cyklin B, ty jsou stabilizovány CSF (cytostatický faktor). Složený ze tří proteinů Mos, MAPK a p90Rsk (Alberio *et al.*, 2001).

3.2.1 Fertilizace

Oplození, v případě savců, je definováno jako proces spojení vajíčka a spermie v samičím reprodukčním ústrojí. Tím je zahájen vývoj nového jedince (Wassarman, 1999). Tento proces spouští specifické signální dráhy v oocytech. V přirozených podmínkách vniká spermie do oocytu a vyvolá zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, která následně osciluje. Zvýšené hladiny cytoplazmatického vápníku ovlivní aktivitu MPF a CSF, což vede k dokončení metafáze II na interfázi (Bing *et al.*, 2003). Oplození zahrnuje dle Wassarman *et al.* (2001) nejméně pět po sobě jdoucích kroků, které se odehrávají v přesném pořadí. Nejprve musí spermie po navázání na ZP projít akrozomální reakcí, poté nastává akrozomální exocytóza. V dalším kroku spermie proniká extracelulární vrstvou. Po proniku

do perivitelinního prostoru, mezi ZP a plazmatickou membránou se naváže na plazmatickou membránu. Dále dochází ke spojení membrány oocytu a spermie, k tvorbě prvojadra a k jejich slnutí, a poté se stává z oplozeného vajíčka zygota. Při exocytóze kortikálních granul, vyvolané přítokem spermií do perivitelinního prostoru, dochází k modifikaci struktury *zona pellucida*, aby se zabránilo dalšímu přítoku spermií do oocytu (Wang *et al.*, 1998). Velkým problémem IVF u prasat je vysoká polyspermie a nepravidelná tvorba samčího prvojadra (Laurincik *et al.*, 1994). Oplození pokračuje znovuzahájením meiózy a vydělením druhého pólóvého tělíska, dekonduzace chromatinu tvorbou paternálního a maternálního prvojadra, zahájením syntézy DNA a následného mitotického dělení (Ben-Aharon *et al.*, 2005).

Obrázek 2: Oplození



Sled reakcí po sobě jdoucích, před a těsně po oplození (Florman a Ducibella, 2006).

Je třeba, aby samotnou fertilizací musí spermie předtím podstoupit kapacitaci, což je proces během kterého se mění metabolismus a pohyblivost spermie. Kapacitace může trvat i několik hodin a probíhá v pohlavním traktu samice (Florman a Ducibella, 2006). Protože spermie čekají na oocyt ve vejcovodu, kapacitace probíhá tam. Spermie mohou ve vejcovodu přežít několik hodin až dní (Töpfer-Petersen *et al.*, 2008). Kapacitace je spojena s rozsáhlými změnami ve fyziologii a biochemii spermie, jako jsou povrchové vlastnosti, složení

periferního membránového proteinu, lokalizace antigenu a povrchového náboje, změna vlastností plazmatické membrány, jako je membránový potenciál, složení lipidů a fosfolipidů, intracelulární pH. Dále dochází k hypermotilitě a chemotaxi. Kapacitance není jednotný proces, ale je to více jednotlivých reakcí (Florman a Ducibella, 2006).

Jedním z dalších významných změn, které spermie musí prodlážit, je akrozomální reakce. Akrozóm je váček, který obsahuje celou sadu proteinů, včetně proteolytických a jinak enzymaticky aktivních a bioaktivních peptidů. Tyto proteiny a peptidy jsou uloženy v retikulární síti (Florman a Ducibella, 2006).

Wassarman (1999) uvádí, že u savců se na hlavici spermie nachází šňavčí ko-vázací protein, který slouží k rozpoznání a vazbě na komplementární molekuly umístěné na *zona pellucida* (ZP). Komplementární molekuly podporují specifickou buněčnou adhezi. Plazmatické membrány vech savčích oocytů jsou zcela obklopeny ZP. U myši bylo prokázáno, že je ZP složena ze tří glykoproteinů mZP1 (200 kDa, dimer), mZP2 (120 kDa), a mZP3 (83 kDa). U myši jsou syntetizované výlučně v rostoucích oocytech. Dva z glykoproteinů, mZP2 a mZP3, spolu navzájem komunikují přes nekovalentní vazby, které jsou propojeny přes dlouhá vlákna s mZP1. Každý z těchto glykoproteinů se skládá z unikátního polypeptidu, který je nestejnoměrně glykosylovaný. Pouze spermie, které mají neporušený akrozóm, se mohou navázat na ZP ovulovaného oocytu. A právě mZP3 slouží jako receptor pro spermie. Ale po oplození se mZP3 mění tak, aby její další volné spermie nemohly rozpoznat (Wassarman, 1999). Prasečí *zona pellucida*, na rozdíl od té myši, je tvořena tyčmi hlavními glykoproteiny pZP1, pZP2, pZP3 a pZP4, také označovaným jako pZP4 (Antosik *et al.*, 2009). G-protein aktivuje mZP3 a dochází k depolarizaci plazmatické membrány spermie, aktivují se vápníkové kanály a zvyšuje se pH a intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Wassarman *et al.*, 2001).

3.2.2 Partenogenetická aktivace

Aktivace oocytu se dá navodit i pomocí umělých stimulů. Vystavení oocytu ethanolu, butyrolaktonu I, kalcium ionoforu A23187, nebo přímým elektrickým impulsem, které mohou zvýšit cytoplazmatickou hladinu vápníku a spustit aktivaci oocytu (Bing *et al.*, 2003). Jako další možná aktivní inidla uvádí Wurga *et al.* (2008) cyklohexamid, stroncium, 6-dimethylaminopurin, chlorid vápenatý. Přímé elektrické impulsy se zdají být v partenogenetické aktivaci prasečích oocytů nejvhodnější, protože jsou schopni navodit

plnohodnotnou aktivaci, nebo potlačí syntézu proteinů odpovědných za udržení oocyty ve stádiu MII (Bing *et al.*, 2003). Elektrické impulzy jsou také nepoužívány při způsobu transplantace jádra (Sun *et al.*, 1992). Kyselina cyklopianozová (CPA) je silný inhibitor endogenního kalcium-dependenčního ATPázy a je schopna indukovat partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů *in vitro* (Petr *et al.*, 2000). BLI (butyrolakton I) je specifický inhibitor CDK a působí jako kompetitivní inhibitor ATP. BLI může inhibovat meiotické zrání oocytů, které jsou ve fázi GV, snížením H1 kinázy. Nebo indukovat aktivaci prasečích oocytů ve fázi MII (Bing *et al.*, 2003). Kalcium ionofor A23187 je schopen přenést vápenaté ionty do buňky z extracelulárních zdrojů (Sedmíková *et al.*, 2003). Mítkem účinnosti je podíl nezralých oocytů a blastocyst (Brevini *et al.*, 2005). Injekce hydrolyzované formy G-proteinu v křečích oocytech indukuje partenogenetickou aktivaci. Experimenty na myších a prasečích oocytech ukazují, že nadměrná exprese membránových proteinů, které se váží na G-proteiny a aktivují fosfolipázu C, vedou k vápníkovým oscilacím a aktivaci oocytu (Alberio *et al.*, 2001). U vajících obojživelníků stimulace protein kináz s deriváty forbolesteru má za následek partenogenetickou aktivaci (Mayes *et al.*, 1995).

3.2.3 Vybrané faktory ovlivňující aktivaci

3.2.3.1 Vápník

Vápník je považován za primární intracelulární signál odpovědný za zahájení aktivace savčích oocytů (Sun *et al.*, 1992). Mimo jiné je vápník univerzální sekundární posel, ovládající v buňkách různé biologické procesy, jako jsou proliferace, diferenciace, transkripční aktivace a apoptóza, v oocytech pak blok polyspermie a dokončení meiózy. Zabránění polyspermii před dokončením meiózy je nezbytné, jinak zygota nezahájí další vývoj (Heytens *et al.*, 2008; Nader *et al.*, 2013). A právě za uvolnění intracelulárního vápníku může přiniknout spermie do oocytu nacházejícího se v MII fázi. Oscilace mohou trvat několik hodin a jsou nezbytné pro obnovení meiotické aktivity. Amplituda, frekvence a délka trvání Ca^{2+} v oplozených oocytech se liší mezi jednotlivými druhy. U prasat mohou oscilace trvat déle než 3 hodiny s průměrnými intervaly mezi vrcholy 15,5 až 18,5 minut (Che *et al.*, 2007). První z vln vápníkových iontů pochází v místě penetrace spermie a je pro ni typická vysoká amplituda a krátké trvání. Postupně amplituda a frekvence klesá a doba trvání se zvyšuje až do úplného zastavení při vstupu do interfáze. Vápníkové ionty také způsobují exocytózu kortikálních granul (Ben-Yosef a Shalgi, 1998). Zvyšující se hladina vápníku také indukuje

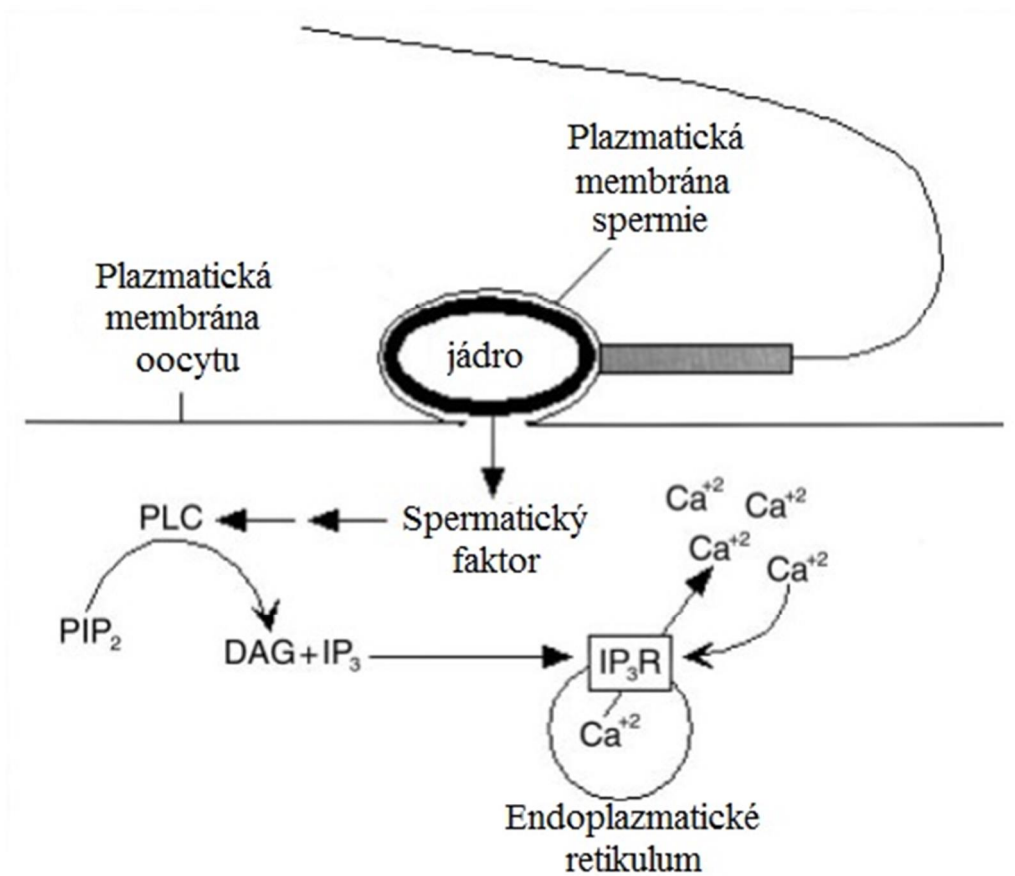
inaktivaci MPF a cytotatického faktoru, ti jsou zodpov dní za udržení oocytu v MII (Wang *et al.*, 1998).

Spermie stimuluje tvorbu inositolu 1,4,5-trifosfátu (IP₃) a aktivuje IP₃ receptor, a tím spou-tí signalizaci vápníkových iont z intracelulárních zásob v oocytu. Jedna z hypotéz faktoru spermie p i fertilizaci navrhuje, fe spermie obsahují rozpustný faktor a tím se vytvá í oscilace vápníkových iont . V mechanismu p enosu signálu je zapojena PL-specifická fosfolipáza C (PLC). Ta hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bifosfát (PIP₂), následkem toho vzniká inositoltrifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ mobilizuje intracelulární vápník vázaný na membránu, který aktivuje protein kinázu C (PKC) a kalcium-dependentní kinázu. Ta p sobí jako efektor v somatických bu kách, transkrip ní faktor a protein podílející se na exocytóze. V my-ích oocytech bylo prokázáno, fe DAG indukuje oscilaci vápníku a exocytózu kortikálních granul a modifikaci ZP (Williams, 2002). Vysoká úrove aktivity PLC enzymu p i fertilizace nazna uje, fe se jedná o hledaný faktor. Po p idání izoformem PLC 1, 1, 2 nebo 1 do oocytu nespou-tí uvoln ní vápníkových iont . Izoforma PLC (PLC), je specificky exprimována v sav ích spermích má v-echny vlastnosti faktoru spermí (Saunders *et al.*, 2002). PLC katalyzuje tvorbu IP₃, který spou-tí uvol ování vápníkových iont a následn indukuje oscilace vápníku v oocytu (Heytens *et al.*, 2008).

Jífl malé množství vápníkových iont je schopno vyvolat otev ení inositol 1,4,5-trifosfátové receptory (IP₃R) kanál a uvolnit tak z cytoplazmatických zásob vápníkové ionty. To poskytuje pozitivní zp tnou vazbu pro uvol ování dal-ích vápníkových iont do cytoplazmy. Pokud hladiny vápníku dosáhnou kritickou hranici, dojde k uzav ení IP₃R kanál . To umofl uje zp tné vychytávání cytoplazmatického vápníku (Williams, 2002).

Vápník aktivuje kalmodulin dependentní kinázou II (CaMKII), cofl je enzym, které je citlivý na frekvenci vápenatých oscilací. CaMKII p ímo aktivuje anafázi podporující faktor (APC) a také podporuje degradaci cytotatického faktoru (CSF). Následkem toho APC uvolní CSF a inhibuje MPF (Heytens *et al.*, 2008).

Obrázek 3: Hypotetický model aktivace oocyt faktorem spermie



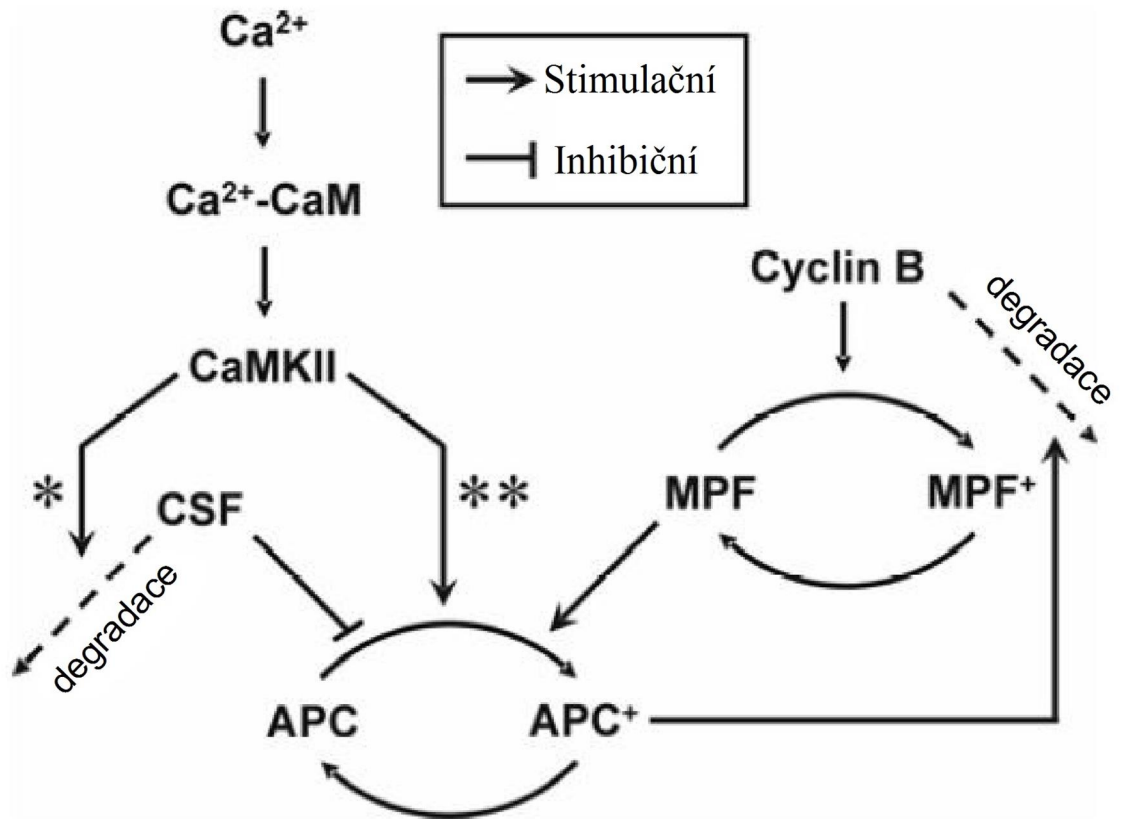
Fúze plazmatické membrány oocytu a spermie umožní uvolnění spermatického faktoru. Ten aktivuje signální kaskádu, jejím výsledkem je aktivace PLC oocytu. PLC katalyzuje hydrolýzu PIP₂, ta vytváří DAG a IP₃. IP₃ působí na IP₃R umístěné v endoplazmatickém retikulu a způsobí uvolnění vápníkových iontů. Ty se podílejí na regulaci zpětné vazby a dalšího uvolnění vápníkových iontů a IP₃R, což má za následek potrubnou oscilaci intracelulárních hladin vápníkových iontů potřebnou pro úspěšnou aktivaci oocytu (Williams, 2002).

3.2.3.2 MPF

MPF (Metaphase Promoting Factor, metafázi podporující faktor) se skládá ze dvou částí: z 34 kDa proteinu a cyklinu B (Kanitz *et al.*, 2001). Nebo, jak uvádí Jones (2005), se MPF skládá z CDK1/Cdc2/p34^{cdc2} katalytické podjednotky a regulační podjednotky cyklinu B1. MPF se podílí na několika funkcích buněného dělení, jako je rozpad jaderného obalu, kondenzace chromatinu, sestavba cytoskeletu a potlačení transkripční aktivity (Heytens *et al.*, 2008). Ukazatelem MPF inaktivace je snížení H1 kinázy (Liu *et al.*, 1998).

Aktivita MPF je udržována cytotatickým faktorem (CSF), a aktivita těchto dvou faktorů musí být pozastavena, aby bylo možné dokončení meiózy (Mayes *et al.*, 1995). Po vydělení prvního pólového tělíska musí oocyt obnovit vysokou aktivitu MPF až do oplození. MPF je zodpovědný za přechod z G2 fáze do M fáze v průběhu meiózy a mitózy eukaryotických buňkách. Inaktivace MPF v průběhu meiózy a mitózy, v metafázi a anafázi silně koreluje s fosforylací p34^{cdc2} a degradací cyklinu B (Mayes *et al.*, 1995). V metafázi dochází k polyubikvitinilaci cyklinu B prostřednictvím navázáním na APC (APC^{cdc2}) E3 ligázou, čímž rychle klesá aktivita MPF, což umožňuje přechod do anafáze (Jones, 2005). CaMKII je zodpovědná za indukci ubikvitinilaci cyklinu B a následnou degradaci v proteazomech, což vede k inaktivaci MPF (Williams, 2002; Madgwick a Jones, 2007). Pro zachování aktivity CSF je důležitá vysoká aktivita Mos/MEK/MAPK (Mos – c-mos proto-oncogene product, MEK – kináza MAP kinázy, MAPK – protein kináza aktivující mitogen) (Cui *et al.*, 2012). Inhibitory MAP kinázy jsou schopny indukovat nebo urychlit aktivaci prasečích oocyt (Mayes *et al.*, 1995).

Obrázek 4: Schématické znázornění znovuoobnovení buněného cyklu



Vápník indukuje znovuzahájení buněného cyklu. Ca^{2+} -CaM-CaMKII rychle aktivuje APC (**), a podporuje degradaci CSF (*). Aktivovaný APC podporuje degradaci cyklinu B, což vede k deaktivaci MPF. V konečném odblokování MII a dovršením buněného cyklu (Heytens *et al.*, 2008).

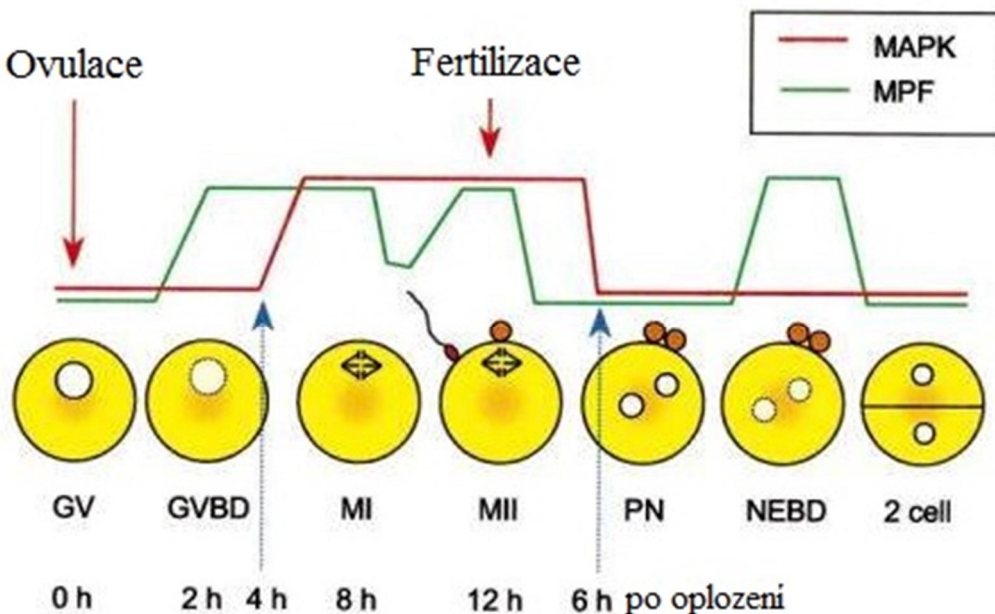
3.2.3.3 MAP-kináza

Dlefitá kináza v regulaci meiotického buněného cyklu je mitogenem aktivovaná protein (MAP) kináza. MAPK je serin/treoninová kináza, která ke své aktivaci vyžaduje fosforylaci (Liu *et al.*, 1998). Aktivace MAPK je komplexní kaskáda, která zahrnuje Mos nebo RAF (RAF-kináza, serin/treonin-specifická proteinkináza). Ty spouští MAPKK kinázy (MAPKKK, kináza kinázy MAP kinázy), ta fosforyluje MAPK kináza (MAPKK, také označována jako MEK) a ta dále fosforyluje MAPK. Savi oocyty v sobě obsahují dvě izoformy MAP kinázy a to ERK1 a ERK2, které jsou aktivovány v průběhu zrání a jsou zapojeny do regulace meiózy (Su *et al.*, 2002).

V průběhu zrání je MAPK aktivována při GVBD a zůstává aktivní až do metafáze II (Moreira *et al.*, 2013). Ovšem u prasat, skotu a koní se MAPK aktivuje před GVBD (Su *et al.*, 2002). MAP kinázy jsou považovány za důležité pro udržení chromatinu ve kondenzovaném stavu při přechodu z meiózy I do meiózy II, aby se zabránilo tvorbě jaderného obalu fosforylací jaderné laminy. Během aktivace oocytů začíná klesat aktivita MAP kinázy, což později není pokles aktivity MPF (Williams, 2002). MAPK má úzkou vazbu na CSF nebo Mos, ale nestabilizuje MPF, jak dokládá pokus Liu *et al.* (1998).

MAP kináza udržuje vysokou aktivitu $p34^{cdc2}$, přes syntézu cyklinu B v MII (Ito *et al.*, 2004). V interkinezi u myších oocytů se předpokládá, že MAP kinázy mají vysokou aktivitu v meióze I, což nahrazuje MPF aktivitu. A to tak, že MAP kináza rozpozná podobnou peptidovou sekvenci pro MPF, Mos má schopnost působit jako MAP kináza, která ovlivňuje MAP kinázu (Jones, 2005). Po proniknutí spermie je aktivita MAP kinázy snížena a následována inaktivací $p34^{cdc2}$. U prasat a myši má snížení aktivity CaMKII také za následek snížení MAP kinázy (Ito *et al.*, 2004).

Obrázek 5: Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání a oplodnění u myši a potkan (Fan a Sun, 2004)



3.2.3.4 Kalcium/kalmodulin dependentní kináza II

CaMKII je aktivována Ca^{2+} a kalmodulinem (Ito *et al.*, 2004). CaMKII se pravděpodobně zapojuje do exocytózy kortikálních granul, a je zodpovědná za přestavbu cytoskeletu v průběhu aktivace oocyta (Williams, 2002). Také hraje důležitou úlohu v kapacitaci a akrozomální reakci spermie (Ito *et al.*, 2004). CaMKII se vyskytuje u myši ve čtyřech hlavních izoformách α , β , γ , a δ . U myších oocytů je převládající γ izoforma nutná k regulaci buněčného cyklu a k aktivaci oocyta (Bacs *et al.*, 2009).

Pokud byly oocyty ošetřeny KN-93 a poté partenogeneticky aktivovány ionoforem, byla potlačena tvorba prvojádra. To poukazuje na důležitou roli CaMKII v tvorbě prvojader, protože KN-93 je výrobcem označován jako specifický inhibitor CaMKII. Inhibice CaMKII inhibičním proteinem negativně ovlivnila histon H1 kinázu, která zodpovídá za hodnoty $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ při oplození u myši. Nárůst intracelulárního vápníku vyvolaný spermií nebo partenogenetickou aktivací, aktivuje CaMKII, což má za následek snížení cyklinu B a inaktivaci $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ kinázy v prvojádrách oocytů (Ito *et al.*, 2004).

CaMKII fosforylace spouští degradaci Emi2 (mitotický inhibitor 1-related protein, Erp1). A to pomocí rozpoznání SCF ubiquitin ligázou (Skp1-Cul1-F-box-protein), která má za následek polyubikvitinilaci Emi2 (Hyslop *et al.*, 2004; Madgwick a Jones, 2007). Negativně CaMKII reguluje vápník/kalmodulin-dependentní proteinkinázy fosfatáza (CaMKP) a její jaderná izoforma CaMKP-N. Ty patří do rodiny serin/treonin proteinových fosfatáz (Sueyoshi *et al.*, 2007).

3.2.3.5 Cyklický adenosin monofosfát (cAMP)

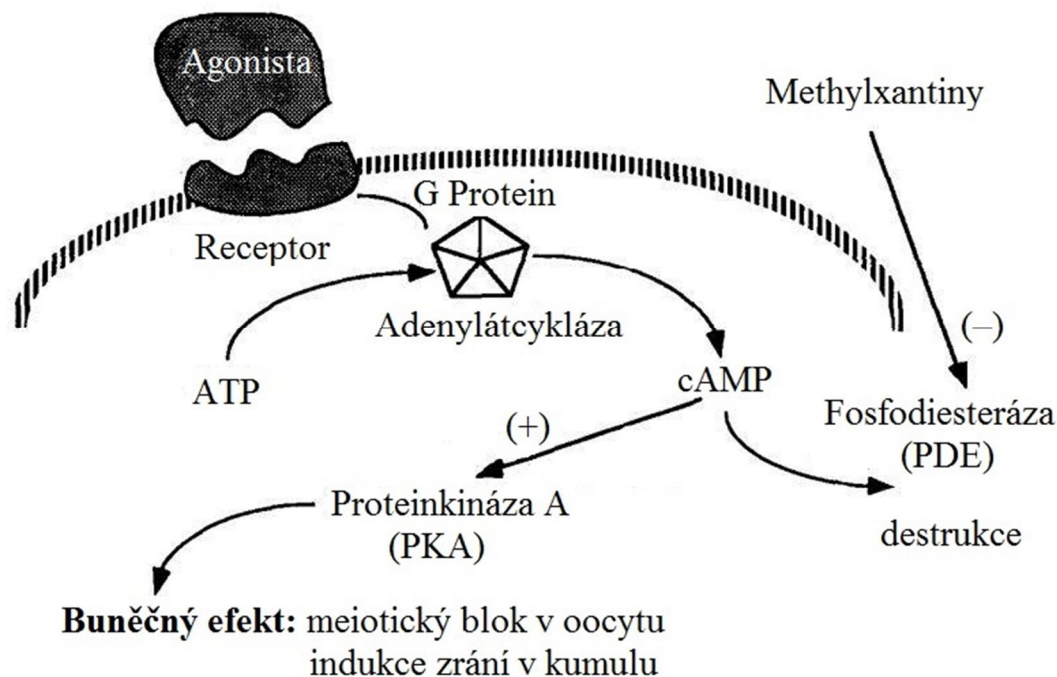
Hormony indukované sekundárním poslem cAMP, regulují řadu různých fyziologických buněčných odpovědí, včetně kontroly zrání. Tyto úinky jsou zprostředkovány aktivací cAMP-dependentní protein kinázy A (PKA). Pak je tetramer, který má dvě regulační a dvě katalytické podjednotky. Existují dvě hlavní izoformy PKA, typ I a II, které mají RI nebo RII podjednotky. Vazba cAMP na regulační podjednotky vede disociaci holoenzymu a uvolnění katalytických jednotek pro fosforylaci substrátů (Fan a Sun, 2004).

PKA je součástí enzymu signální transdukce včetně AC (adenylátcyklázy) a PDE (fosfodiesterázy). AC lze přivést na ATP, tato aktivita je pod kontrolou G-proteinů (Sirard *et al.*, 1998).

Vysoká hladina cAMP u myší a hlodavců udržuje oocyt v meiotickém bloku, naopak pokud je hladina cAMP snížena dochází k obnovení meiózy (Sasseville *et al.*, 2007). Oocyty komunikují s kumulárními buňkami pomocí gap junction, a provedené pokusy ve studii Fan a Sun (2004) potvrzují, že cAMP může difundovat z okolních buněk do oocyty. Vysoká hladina intracelulárního cAMP v oocyty je podmíněna gap junction spoji, proto je tato hladina vysoká dokud se nachází oocyt ve folikulu (Appeltant *et al.*, 2015). Degradace cAMP probíhá pomocí fosfodiesterázy (PDE3) (Sasseville *et al.*, 2007). Degradace cAMP v neovulovaném oocyty je znemožněna, protože fosfodiesteráza (PDE) je inhibována pomocí cyklického guanosin monofosfátu (cGMP), který oocyty dodávají kumulární buňky (Appeltant *et al.*, 2015). cGMP působí jako další inhibiční signál a udržuje meiotický blok v savčích oocytech, přechází přes kumulární buňky přes gap junction do oocyty, kde inhibuje hydrolýzu cAMP fosfodiesterázu 3A (PDE3A), což má za následek vysokou koncentraci cAMP a udržení meiotického bloku oocyty (Tripathi *et al.*, 2010). Nedávné studie poukazují, že kumulární buňky se přímo účastní tvorby cGMP sekrecí natriuretického peptidu C (NPPC). Ten se váže a aktivuje receptor NPR2 (natriuretický receptor C) a guanyl cyklázu (Von Stetina a Orr-Weaver, 2011). Intracelulární hladiny cAMP jsou modulací rovnováhy mezi jeho degradací a syntézou (Sasseville *et al.*, 2007).

O PDE je známo, že hrají důležitou roli ve fyziologii vaječného vajíčka. U hlodavců jsou nejvíce prostudovány dva podtypy PDE3 a PDE4. Kdy PDE3a je přítomna pouze v oocyty, PDE4d je v granulárních buňkách, PDE4b v buňkách *theca folliculi*. Myší knockoutované deficiencí PDE4a jsou neplodné z důvodu neschopnosti oocyty pokračovat v meióze (Sasseville *et al.*, 2007).

Obrázek 6: Zjednodušené schéma řízení cAMP v buňce (Sirard *et al.*, 1998)



3.2.3.6 Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou endogenně generované molekuly plynu, které slouží jako signální molekuly. Plynné signální molekuly jsou velmi důležitě a nenahraditelné. Do rodiny gasotransmiterů patří oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sirovodík (H₂S), jedni z dalších možných kandidátů jsou amoniak a metan (Wang, 2014).

Oxid uhelnatý (CO)

Produkce CO v organismu se účastní dva hlavní enzymy, hemoxygenáza-1 (HO-1), která je indukovatelná a konstitutivní hemoxygenáza-2 (HO-2), také byla v potkaním mozku identifikována forma HO-3 s nízkou aktivitou. HO-1 a HO-2 izoformy byly prokázány v lidském endometriu. Funkce CO v organismu spočívá ve vazodilataci cév, snížení krevního tlaku a v ochraně srdce před ischemií (Wang, 2014). Dále chrání organismus před oxidativním stresem v centrálním nervovém systému. tím také CO inhibuje zpožděné usměrnění K⁺ kanálů (Peers a Lefer, 2011; Cella *et al.*, 2006).

Cella *et al.* (2006) inhibovali HO aktivitu a její expresi u potkanů. Výsledky naznačily, že HO aktivita může regulovat dle potřeby hemoglobinovou syntézu pomocí cGMP a tím může působit jako obrana proti oxidačnímu stresu. HO byla prokázána také v potkaních ováriích, a CO hraje roli při vzniku ovariálních steroidů (Alexandreaanu, a Lawson, 2003).

Sirovodík (H₂S)

Sirovodík v organismu vzniká v endotelu a hladkém svalstvu cév enzymatickou reakcí z cysteinu a homocysteinu, konkrétně pomocí cystathionin-β-syntázy (CBS), cystathionin-γ-lyázy (CSE) a 3-merkaptosulfurtransferázy (3-MPST) (Peers a Lefer, 2011).

Nevoral *et al.* (2014) ve své studii uvádí, že sirovodík urychluje zrání prasečích oocytů. Sirovodík může aktivovat MPF a MAPK, nicméně to nebylo zatím prokázáno. Kromě přímé regulace na MPF a MAPK může sirovodík působit nepřímo, na kinázy úpravou jiných molekul. Bylo prokázáno, že sirovodík působí přímo na oocyty, nikoliv přes kumulární buňky, protože oocyty zbavené kumulárních buněk dozrávají rychleji než oocyty s kumulací (Nevoral *et al.*, 2014).

Krejčova *et al.* (2015) ve svých experimentech prokázali, že enzymy produkující sirovodík jsou aktivní v prasečích oocytech. Dále prokázali, že dochází ke statické významnému poklesu produkce sirovodíku od prvního dne stárnutí prasečích oocytů. Inhibice tohoto enzymu urychluje stárnutí oocytů. I přesto nebyly zjištěny jednoznačné účinky exogenních H₂S na MPF a MAPK (Krejčova *et al.*, 2015).

Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý hraje důležitou roli v intracelulární signalizaci. NO je prostředník lokálního působení hormonů a neurotransmiterů v regulaci mnoha zásadních fyziologických procesů v reprodukci. Syntáza oxidu dusnatého (NOS), produkující NO, byla identifikována v různých tkáních reprodukčního ústrojí, například ve vaječnicích. I v oocytech probíhá její exprese a také ve folikulární tekutině byl zaznamenán NO (Schwarz *et al.*, 2014).

NO je syntetizován v různých buňkách pomocí syntázy oxidu dusnatého (NOS) z L-argininu. NOS se vyskytuje ve třech izoformách, které jsou dimery se stejnými podjednotkami. Neuronová NOS (nNOS) a endoteliální NOS (eNOS) jsou vápník/kalmodulin dependentní a produkují malé množství NO po krátkou dobu. Indukovatelná izoforma NOS

(iNOS) vytváří stabilní množství NO po delší dobu. Syntéza NO je nezávislá na hladině vápníku a kalmmodulinu. NO se podílí na regulaci růstu folikulů a následné ovulaci a implantaci embrya (Petr *et al.*, 2005). Vysoká koncentrace NO může narušit postup do MII a embryonálního vývoje. NO má vliv na meiózu, při nízkých koncentracích může stimulovat zrání a naopak při vysokých může zrání inhibovat, produkuje oxidační stres a apoptózu (Schwarz *et al.*, 2014; Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014). NO je nezbytný pro přechod z MI do MII. Inhibice NOS potlačuje expanzi kumulárních buněk v oocytech ovce. NO je schopen aktivovat praseí oocyty a vajíčka obojživelníků (Nevoral *et al.*, 2013). Zvýšením intracelulárních hladin NO je následováno zvýšením intracelulárních vápenatých iontů a dochází k aktivaci vajíček myší a jeřovky (Petr *et al.*, 2005).

3.2.3.7 Mos-protein a CSF

MPF je primární faktor zajišťující meiotický blok, zatímco CSF je sekundární faktor. Mos-protein může dokonce zablokovat první mitotické dělení v embryích. Oocyty bez CheMos 1 (jeden z genů řídící c-mos) mohou překonat fázi GVBD, ale nejsou schopny překonat meiotický blok a tím pádem ani vydlížit pólové tělíčko (Extavour, 2009). CSF inhibuje APC k zachování MPF in vivo. Emi2 inhibuje APC a tím udržuje MPF. (Madgwick a Jones, 2007).

C-mos produkt onkogenu pp39mos je přítomen v neoplovných vajíčkách u *Xenopus* (Ito *et al.*, 2007). C-mos je zodpovědný za inaktivitu MPF a může regulovat MAPK (Liu *et al.*, 1998). Celá regulační kaskáda se nazývá Mos-MEK-MAPK. Po injekci c-mos do flabíků a myších embryí je indukováno zastavení v metafázi A jeho odstranění ze flabíků a myších oocytů brání bloku v MII. Poté, co dojde ke zvýšení intracelulárního vápníku, který indukuje degradaci cyklinu, prochází Mos ubikvitin-dependentní degradací proteazomem (Williams, 2002; Yamamoto *et al.*, 2008). Cytostatický faktor (CSF) má schopnost zablokovat chromatin v metafázi II. Produkt genu c-Mos je zodpovědný za inaktivitu CSF v myších oocytech a flabíčkách vajíček (Jones, 2005).

Myší oocyty postrádající Mos gen přesto vstupují do MII fáze, ale následně procházejí spontánní aktivací, vydlíkuje se druhé pólové tělíčko a tvoří se prvojádra. V těchto oocytech nebyly pozorovány aktivní formy MEK a MAPK (Ito *et al.*, 2007).

3.3 Kalcineurin

Kalcineurin neboli protein fosfatáza 2B, nebo také vápník-dependentní fosfatáza, je hlavním regulátorem vápníkových iontů, jako signál buněčných odpovědí, přes kalmodulin-vazebný protein. Jedná se o heterodimer skládající se ze dvou podjednotek. Z katalytické podjednotky A, která je kalmodulin-vázající o 58-64 kDa a z regulační podjednotky B o 19 kDa (Klee *et al.*, 1998; Jessup a Haccard, 2007). Katalytická podjednotka A má tři izoformy CnA₁, CnA₂, CnA₃ a regulační podjednotka má dvě izoformy CnB1 a CnB2 (Tomová *et al.*, 2013). Geny, které kódují izoformy podjednotky A jsou Ppp3ca, Ppp3cb, a Ppp3cc, a podjednotky B kódují geny: Ppp3r1 a Ppp3r2 (Li *et al.*, 2011).

3.3.1 Chemické složení a regulace aktivity

Kalcineurin je klasifikován jako serin/treonin protein fosfatázu (Rusnak a Mertz, 2000). Fosfatázy jsou nezbytné pro adu přenos signálů v eukaryotických buňkách. Kalcineurin je rozdělen do dvou typů, rozdíly mezi těmito typy jsou v inhibitech, a v rozdílu v dvojmocných kovových iontech, v jejich závislosti vedly k rozdělení enzymů do PP2A, PP2B (kalcineurin), a PP2C. U PP2A nebyl zjištěn obsah dvojmocných kovových iontů. Kalcineurin PP2B obsahuje Ca^{2+} a je regulován kalmodulinem, zatímco PP2C obsahuje Mg^{2+} . I když se PP1 a PP2A a kalcineurin liší obsahem kovových iontů, mají homologní sekvence aminokyselin a jsou si vývojově příbuzné. V rámci aktivní domény, PP1 sdílí 49 % identitu aminokyselin s PP2A a 39 % s kalcineurinem. V rámci struktury se aktivní místo nachází na podjednotce A, která je u savců velikostně 57659 kDa, v závislosti na izoformě (Rusnak a Mertz, 2000). Kalcineurin B Ca^{2+} -vazebný protein byl identifikován na základě své aminokyselinové sekvence. Je velice podobný kalmodulinu se dvěma laloky, z nichž se každý skládá ze dvou sousedních Ca^{2+} vazebných smyček, které jsou spojeny flexibilní spojovací řoubovicí (Klee *et al.*, 1998).

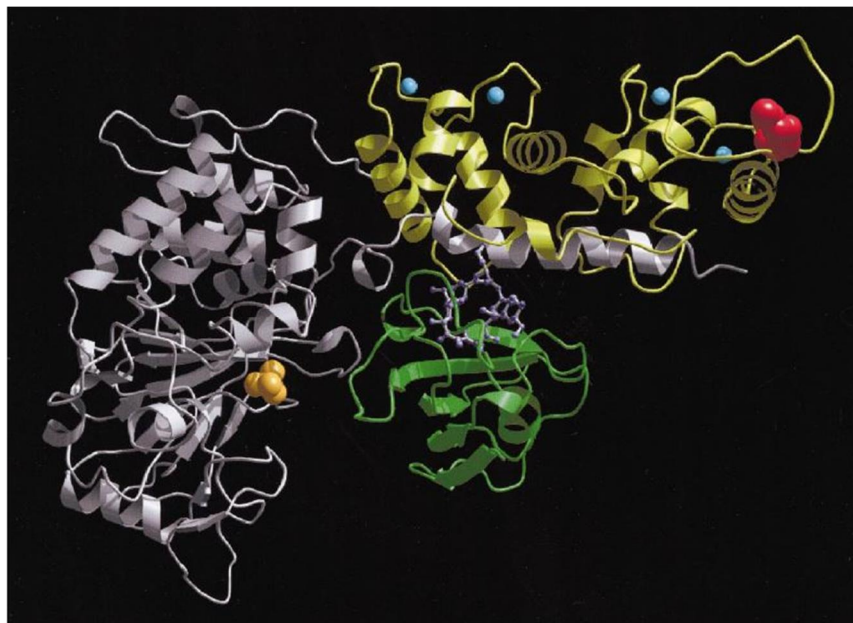
Substrátová specifita kalcineurinu není způsobena pouze specifickou sekvencí, ale také primárním určením výše uvedených konstrukčních prvků. Aktivace je výsledkem vápník-dependentní vazby kalmodulinu na kalcineurin. Koncentrace vápníku potřebná k aktivaci se snižuje se zvyšující koncentrací kalmodulinu, a koncentrace kalmodulinu potřebná pro aktivaci se snižuje se zvyšující se koncentrací vápníkových iontů. Vysoce

kooperativní vápníkové ionty mají závislost na stimulaci kalmodulinu a tudíž i kalcineurinu, tak umožní uje enzym reagovat na prahové hodnoty vápníkových iontů. Stejně jako u většiny kalmodulin-regulovaných enzymů se u mechanismu aktivace předpokládá vazba na kalmodulin-vázací domény, to má za následek posunutí auto-inhibující domény. Struktura kalmodulin-vázací domény je flexibilní (Klee *et al.*, 1998).

Fosforylace proteinů a defosforylace reakce jsou obecně klasifikovány podle cílové specifity do serinových/treoninových na dvě specifické kinázy a fosfatázy. Běžná specifita kináz a schopnost fosforylace je výrazně ovlivněna primární strukturou v blízkosti cílového místa. Proteinové fosfatázy vykazují menší závislost na primární struktuře, ale vyjadřují aspekty sekundární struktury pro rozpoznání substrátu (Martin, 1998).

Specifická inhibice kalmodulin-stimulované proteinové fosfatázy kalcineurinu FK506 a cyklosporinu A v komplexu s vazebnými proteiny cyklofilinu a FKBP (vazebný protein) naznačuje, že si tyto látky mohou konkurovat s endogenními ligandy a mohou modulovat aktivitu kalcineurinu *in vivo*. Vysoká koncentrace vazebného proteinu FK506 a FKBP v mozku naznačuje i vysokou koncentraci endogenních regulačních ligandů (Stemmer *et al.*, 1995). Tím lymfocyty mohou být stimulovány buď antigenem nebo kombinací kalciového ionoforu A23187, forbol myristát acetátu dochází k potlačení a přechodné mobilizaci vápníkových iontů. Následuje inaktivace vápník/kalmodulin dependentní kinázy, která je součástí kalcineurinu. Tímto je přes autokrinní stimulační mechanismus, imunosupresiva (FK506 a cyklosporin A) uplatní své účinky vazbou na příslušném buněčném akceptoru, inhibicí kalcineurinu (Takuwa *et al.*, 1995).

**Obrázek 7: Strukturní schéma trojrozměrného kalcineurinu v komplexu s FK506-
FK506 vazebným proteinem (FKBP)**



Šedá je zbarvená katalytická podjednotka kalcineurinu, žlutá kalcineurin B, FKBP je zbarven zelená. Vápník z B podjednotky je znázorněn jako modré koule, merystoyl skupiny B je zbarven červeně (Rusnak a Mertz, 2000).

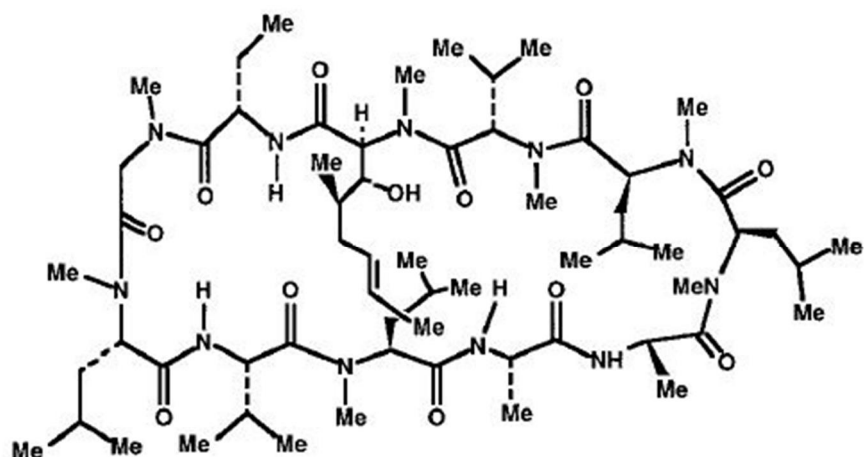
3.3.2 Inhibitory

Cyklosporin A (CsA) a FK506 inhibují kalcineurin v signálních dráhách intracelulárních vápníkových iontů, přičemž výsledek této dráhy může být apoptóza. Cyklosporin a FK506 patří mezi nejúspěšnější známé inhibitory kalcineurinu. Je zajímavé, že k inhibici těchto látkami *in vitro* dochází pouze tehdy, když je fyziologický substrát obohacen o fosfokasein nebo fosfo-RII peptid, jejich sekvence představuje místo pro fosforylaci regulační podjednotky cAMP-dependentní proteinkinázy. Mezi další sloučeniny, které se podílejí na inhibici kalcineurinu a dalších serin/treonin fosfatáz, je kyselina okadaová. Ta je často využívána jako silný a specifický inhibitor PP2A, ale může také inhibovat PP1 při vyšších koncentracích (Rusnak a Mertz, 2000). Cyklický peptid mikrocistin-LR, který produkují cyanobaktérie, inhibuje PP1 a PP2A. Jedná se o relativně silný inhibitor (Rusnak a Mertz, 2000; Ward *et al.*, 1997). Diberfurin je C₁-symetrický metabolit hub, který také inhibuje kalcineurin fosfatázy (Ellerbrock *et al.*, 2014). Dalšími inhibitory jsou PD 144795, metanilovaný fosfonát, cypermetrin, deltametrin a fenvalerát (Rusnak a Mertz, 2000; Petr *et al.*, 2013).

Cyklosporin A

Jedná se o cyklický undekapeptid složený z jedenácti aminokyselin cyc-[MeBmt-alfa-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal], který byl izolován z plísně vlákenné houby *Tolypocladium niveum*. Cyklosporin je bílá, krystalická látka bez chuti a zápachu, která nemá volnou karboxy- ani amino- skupinu a proto je ve vodě nerozpustná. Biosyntéza probíhá v houbách mimo ribozomy pomocí komplexu enzymů. Tento způsob zajišťuje pospojování nekódovaných aminokyselin a díky multienzymovému komplexu vede k vytvoření celé řady podobných cyklosporinů (Maha *et al.*, 1994). Cyklosporin A se užívá jako inhibitor vápník/kalmodulin dependentní fosfatázy, tedy kalcineurinu. Cofl je využíváno v medicíně, cyklosporin A se používá k potlačení imunitní reakce, aby se předešlo odmítnutí transplantátu u pacienta. Mechanismus imunosuprese je závislý na inhibici vápníku (Patiny *et al.*, 2003).

Obrázek 8: Cyklosporin A



Chemický vzorec cyklosporinu A (Rusnak a Mertz, 2000).

3.3.3 Fyziologická funkce kalcineurinu v organismu

Kalcineurin má různé buněčné funkce v různých typech buněk u různých organismů. Je to inhibitor CaM (kaldmodulin) (Lee *et al.*, 2013). Hraje důležitou roli ve vývoji a diferenciaci buněk, je hodně studován pro své zapojení do imunity u savců, řízení transkripčních procesů v souvislosti s vápníkovými ionty, zkoumá se také jeho role v membránové aktivitě. Bylo prokázáno, že reaguje na kationtový pHliv a aktivitu kanálů (Fraga *et al.*, 2010). U T a B lymfocytů a neuronových buněk hraje kalcineurin důležitou roli v apoptóze a to přes cytochrom c/kaspázy-3 dráhy (Rusnak a Mertz, 2000).

Rusnak a Mertz (2000) publikovali, že kalcineurin je široce distribuován ve tkáních savců, v nejvyšší koncentraci se nachází v mozku. Kromě toho byly pozorovány podjednotky kalcineurinu A a B v tukové tkáni, v buňkách nadledvin, v kostních osteoklastech, v srdci, v zadním mozku a míše, v ledvinách, v játrech, v B a T lymfocytech, v plicích, v čichovém bulbu, ve slinivce břišní, v placentě, v krevních destičkách, v sítnici, v kosterní svalovině, v hladkém svalstvu, ve slezině, ve varlatech, ve spermii, v brzlíku a ve vnitřní fláze. Rusnak a Mertz (2000) uvádí, že existují přesvědčivé důkazy o existenci kalcineurinu v jádře spolu s dalšími kalmmodulin vázajícími proteiny, jako je kasein kináza-2. Ve spermatidách byl kalcineurin lokalizován v jádře a jeho hladiny byly nejvyšší po úplné elongaci (Rusnak a Mertz, 2000).

Kalcineurin a NFAT (nukleární faktor aktivovaných T bun k) jsou zapojeny do signální dráhy odpov dné za srde ní morfologii a za vyvolání srde ní hypertrofie. Zvý-ená exprese kalcineurinu vedla u transgenních my-í k srde ní hypertrofii a srde nímu selhání, proto my-ím musel být podán jeho inhibitor imunosupresivní cyklosporin A. Proto vznikají dohady, zda by cyklosporin A a FK506 mohly být poufívány jako léky p i hypertrofii. Kalcineurin defosforyluje cytoplazmatický NFAT, z d vodu podpory translokace NFAT do jádra, kde váfle cílové promotory pro ízení exprese gen s r znými funkcemi. NFAT proteiny aktivují T lymfocyty, organizují r zné vývojové kaskády, jako nap íklad vývoj nervový, kardiovaskulární, hematopoetický a vývoje sval a kostí, udržují v klidovém stavu kmenové bu ky v k fli (Rusnak a Mertz, 2000; Li *et al.*, 2011). NFAT a kalcineurin jsou zapojené do signální dráhy p i zm n nediferencovaných embryonálních kmenových bun k (ESC) do bun k linií specifických. U raného vývoje my-í za íná p em na na specifickou linii 2,5 den embryonálního vývoje, to je v 8bun ném embryu. (Li *et al.*, 2011).

Hämäläinen *et al.* (2009) poukazují na fakt, fle kalcineurin m fle hrát d leffitou roli p i regulaci iNOS. Studie prokázala, fle inhibice kalcineurinu snižuje produkci NO u makrofág , které byly vystaveny zán tlivým stimul m. Jak je jifl známé, NO má vliv na vazodilataci cév. A práv kalcineurin m fle inhibovat proliferaci bun k hladkého svalstva cév (Li a Sun, 2005).

3.3.4 Fyziologická funkce kalcineurinu v reprodukci

P i oplození dochází k nár stu vápenatých iont v oocyt , které spou-tí r zné reakce. U obratlovc mezi tyto reakce pat í výstup (z MII) a exocytóza kortikálních granul. Vápníkové ionty aktivují kalmodulin dependentní kinázu II pro výstup z MII (Mochida a Hunt, 2007). Kalcineurin je po uvoln ní vápníku rychle a p echodn aktivován, jeho inhibice zhor-uje hned n kolik d leffitých proces , které souvisí s vápníkovými ionty. Pat í mezi n degradace cyklinu B, defosforylace protein fosforylovaných v MII fázi, migrace prvojader a p eskupení cytoskeletu v kortikálních oblastech, tedy bezprost edn pod bun nou membránou. Aktivace kalcineurinu je tedy nezbytná pro vystoupení z meiotického bloku. Aktivace kalcineurinu musí být p echodná, aby umofnila migraci sam ího a sami ího prvojádra a mohlo dojít k jejich spojení a následnému vytvo ení jádra zygoty (Jesus a Haccard, 2007). V oocytech v MII u *Xenopus laevis* je vysoký obsah Cdc2-cyklin B. P i oplození dochází ke zvý-ení cytoplazmatického vápníku, který aktivuje CaMKII. Ta

fosforyluje Erp1, který je degradován pomocí E3 v proteazomech. Degradace Erp1 je důležitý krok k uvolnění flabíků vajíček z MII, protože Erp1 inhibuje APC. Mochida a Hunt (2007) přidali do flabíků vajíček Erp1, který nepodléhá degradaci a sledovali, zda po přidání vápníkových iontů dojde k aktivaci APC i přes to, že MPF zůstala aktivní. APC byl nakonec přechodně aktivován a došlo ke zvýšení vápník-dependentní protein fosfatázy. A právě kalcineurin se jeví jako nejpravděpodobnější kandidát, který toto spouští. Po ošetření flabíků vajíček inhibitorem kalcineurinu cyklosporinem A nedochází k degradaci cyklinů a k celkové defosforylaci M-fázových specifických fosfoproteinů (Mochida a Hunt, 2007).

Úlohu kalcineurinu v reprodukci a jeho kaskádu popsali také podrobněji Nishiyama *et al.* (2007) u oocytů *Xenopus laevis*. Kalcineurin byl aktivován hned po zvýšení vápníkových iontů, a to v koncentraci, která umožňuje dokončení meiózy. Imunoblotová analýza ukázala, že hladina kalcineurinu během změny aktivity byla konstantní. CaMKII byla přechodně aktivována ihned po přidání vápníkových iontů a přechodně došlo také k aktivaci obou podjednotek kalcineurinu. Pokud byla inhibována aktivita kalcineurinu, je pomocí degradace cyklinu B zablokována degradace CDK1. Také nedocházelo k dekonenzaci chromatinu spermie, která je důležitá pro normální průběh oplození. Pokud nedojde k degradaci CDK1 nemůže dojít ani k prolomení bloku MII. Pokud byla udržována vysoká aktivita kalcineurinu i po aktivaci, zablokovala se tvorba paprskovitého centrosomu, který je nezbytný pro první mitotické dělení embrya. Aktivace a následná inaktivace kalcineurinu je v oplozených vajíčkách *Xenopus laevis* nutná pro zahájení embryonálního vývoje (Nishiyama *et al.*, 2007).

Aktivita kalcineurinu je nezbytná pro dokončení meiózy u oocytů *Drosophila*, pokud dojde k jeho zablokování, přeručí se i průběh meiózy v anafázi I (Petr *et al.*, 2013). Modulační kalcineurin-integrující proteiny (MCIPs), jinak nazývané regulátory kalcineurinu (RCNs), nebo také DSCR1 (Downs syndrome critical region 1) u *Drosophila* jsou nezbytné pro meiotické zrání oocytů. Tyto proteiny jsou kódované genem *Sra*, ten je spojen s katalytickou podjednotkou kalcineurinu a jeho nadměrná exprese potlačuje aktivovaný kalcineurin. U homozygotů alely *sra*KO u larev a kulek došlo k semiletalitě. Samice pozitivní na *sra*KO byly sterilní a jejich ovulace byla abnormální (Takeo *et al.*, 2006).

Tomová *et al.* (2013) zkoumali roli kalcineurinu v průběhu rstu, získávání meiotické kompetence a zrání prasečích oocytů a kumulárních buňkách, kde analyzovali expresi a lokalizaci kalcineurinových podjednotek mRNA. V oocyttech byla mRNA u kalcineurinu A v izoformách CnA₁, CnA₂ a kalcineurinu B v CnB2. V kumulárních buňkách byla mRNA kalcineurinu A v izoformách CnA₁, CnA₂ a kalcineurinu B v izoformách CnB1 a CnB2.

Imunocytochemická analýza prokázala přítomnost kalcineurinu A i B v průběhu rstu, získávání meiotické kompetence a zrání prasečích oocytů. Nejvyšší intenzita fluorescence kalcineurinu A byla zaznamenána v růstové fázi v korové oblasti oocytů. Naopak nejnižší intenzita byla detekována v jádře a nulová intenzita byla zaznamenána v jadérku. Intenzita fluorescence kalcineurinu A se průběžně měnila. Při GVBD a v první metafázi meiotického dělení se v oblasti dílčího vřeténka a v cytoplazmu intenzita neměnila. Ale při druhé metafázi meiotického dělení v cytoplazmu zejména v korové oblasti došlo ke zvýšení intenzity fluorescence kalcineurinu A. Obdobně na tom byla i fluorescence kalcineurinu B, nejnižší intenzita byla naměřena v jádru. Naopak v rostoucích oocytech nebyl žádný rozdíl v intenzitě fluorescence v cytoplazmu nebo v jádře. Ke zvýšení intenzity došlo po obnovení zrání v jádře oocytů i v MII bylo pozorováno zvýšení v intenzitě fluorescence v korové oblasti a cytoplazmu (Tomová *et al.*, 2013).

Petr *et al.* (2013) studovali vliv cypermetrinu, deltametrinu a fenvalerátu, jako specifických inhibitorů protein fosfatázy kalcineurinu, na zrání *in vitro* prasečích oocytů v různých stupních meiotické kompetence. Cypermetrin, deltametrin a fenvalerát jsou takzvané pyrethroidy, které se vyvíjejí jako insekticidy. Pyrethroidy jsou vysoce účinné syntetické deriváty přírodních toxinů. Během studie bylo prokázáno, že cypermetrin, deltametrin a fenvalerát v žádné testované koncentraci neměly významný vliv na životaschopnost ani na degeneraci oocytů. Nicméně měly významný vliv na *in vitro* zrání oocytů prasat. U oocytů, které byly částečně meioticky kompetentní a byly ošetřeny pyrethroidy, bylo indukováno zrání. Dorostlé oocyty s plnou meiotickou kompetencí dozrávaly opožděně. Pokud byly použity nepyrethroidní inhibitory kalcineurinu (cyklosporin nebo hymenistatin I) byly výsledky obdobné jako u inhibitorů pyrethroidních. Pokud byli použity pyrethroidy, které nejsou inhibitory kalcineurinu, allethrin nebo permethrin, nebyl zjištěn žádný efekt na *in vitro* zrání prasečích oocytů (Petr *et al.*, 2013).

Katalytická podjednotka A a Ca^{2+} -vázný protein, tedy podjednotka B kalcineurinu, byly objeveny u spermie psa, prasete a jeřovky (Tash *et al.*, 1988). Bennett *et al.* (2010) ve svém pokusu dokázali, že pokud došlo k inhibici kalcineurinu cyklosporinem A, inhibovala se také akrozomální exocytóza u lidských spermií.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Získávání vaje níky

Vaje níky byly získány z prepubertálních prasnic, které byly poraženy na jatkách. Do laborato e byly dopraveny v co nejkratším ase ve vyh áté termoláhvi na 38 °C, která byla napln ěna chloridem sodným o koncentraci 0,9 %. Následn ě byly opláchnuty ve fyziologickém roztoku o stejné teplot ě.

4.1.2 Získávání oocyt

Oocyty byly aspirovány z folikul ů velkých 2 ó 5 mm pomocí jehly se st íka kou. Získané oocyty byly p eneseny sklen nou pipetou do modifikovaného média M199 pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645). Pro experimenty byly vybrány pouze oocyty s neporu ěnou cytoplazmou a kompaktním kumulem.

4.1.3 Kultiva ní média pro *in vitro* zrání oocyt

Pro manipulaci a kultivaci prase ěch oocyt *in vitro* bylo zvoleno médium M199. Které bylo obohaceno o HEPES, laktát sodný, pyruvát sodný, gentamicin, 7% uhlí itan sodný (Sigma-Aldrich, N mecko), fetální telecí sérum (Gibco BRL, Life Technologies, N mecko) a eCG : hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko). Podrobný pom ěr a soupis jednotlivých slofek kultiva ního média M199 je rozepsán v tabulce 2. Roztok byl sterilizován a ulofěn p ě teplot ě 4 °C v prost edí sm ěsi 5% CO₂ se vzduchem, po dobu maximáln ě jednoho týdne.

Tabulka 2: Poměr složek obohacující médium M199 pro *in vitro* zrání prasečích oocyt

Složka	g/ 100 ml média M199
HEPES	0,15
laktát sodný	0,06
pyruvát sodný	0,025
gentamicin	0,0025
7 % uhličitán sodný	0,039 ml/l
fetální telecí sérum	10% (w/v)
eCG	13,4 IU/ml
hCG	6,6 IU/ml

4.2 Metody

4.2.1 *In vitro* kultivace oocyt

Oocyt byly kultivovány *in vitro* v 1 ml modifikovaném médiu M199 v miskách se čtyřmi jamkami (NUNC, Roskilde, Dánsko). Kultivace probíhala po dobu 46 hodin do stádia metafáze druhého meiotického dělení (MII) při teplotě 39 °C ve směsi 5% CO₂ se vzduchem.

4.2.2 Partenogenetická aktivace zralých oocyt

In vitro zralé oocyt, s mechanicky odstraněnými kumulárními buňkami, byly ošetřeny 25 mM kalcium ionoforem A 23187 (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 5 minut při teplotě 39 °C ve směsi 5% CO₂. Poté byly oocyt krátce opláchnuty v médiu bez kalcia (Jílek *et al.*, 2001) a kultivovány po dobu 24 hodin do stádia vzniku prvojadra.

4.2.3 Ošetření oocyt inhibítorem kalcineurinu

Jako inhibít kalcineurinu byl použit v tomto experimentu cyklosporin A (CsA). Zásobní roztok o koncentraci 8 mM byl zředěn dimethylsulfoxidem (DMSO). Předchozí experimenty ukázaly, že kontrolní přidání DMSO ve stejných koncentracích, jako byly rozpouštěny inhibít kalcineurinu během kultivace oocyt, nemělo žádný účinek na zrání oocyt *in vitro*. Koncentrace cyklosporinu A byla stanovena na základě experimentu Petr *et al.* (2013).

4.2.4 Barvení oocyt pro lokalizaci jednotlivých izoforem kalcineurinu

Zralé i partenogeneticky aktivované oocyty byly mechanicky zbaveny kumulárních bun k pipetováním přes tenkostinnou sklenou kapiláru. V 0,1% pronáze v PBS byla oocyt m odstran na *zona pellucida* a následn byly omyty ve t ech kapkách 0,1 % BSA v PBS. Poté byly oocyty fixovány v 2,5 % (w/v) paraformaldehydu v PBS p i laboratorní teplot po dobu jedné hodiny. P i laboratorní teplot byly nafixované oocyty 120 minut permeabilizovány 0,5 % (v/v) Tritonem X-100 v PBS. V dal-ím kroku byly oocyty krátce omyty v 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS a poté inkubovány v inkuba ním médiu (0,1 % (w/v) BSA a 0,01 % (v/v) Tween 20 v PBS) s primární my-í protilátkou anti-kalcineurin A nebo B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, N mecko). Ta byla poufita v pom ru 1:100 a oocyty byly inkubovány p es noc v teplot +4 °C ve vlhkém prost edí. Nenavázané protilátky byly odstran ny promýváním oocyt v roztoku 0,1% (v/v) Tween 20 v PBS. Následn byly oocyty inkubovány, ve tm a p i laboratorní teplot po dobu 60 minut, v inkuba ním médiu se sekundární protilátkou anti-my-í IgG konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, N mecko). Poté byly oocyty 3x promyty v roztoku 0,1% (v/v) Tween 20 v PBS a na 10 minut v roztoku 0,1% (w/v) BSA v PBS. Nakonec byl obarven chromatin pomocí barviva 4', 6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Oocyty byly zamontovány v glycerolové kapce v PBS na podlofním sklí ku.

Oocyty v kontrolní skupin byly o-et eny stejn , s výjimkou poufítí primární protilátky v inkuba ním médiu.

4.2.5 Vyhodnocení experiment

Vyhodnocení aktivace oocytu

Po inkubaci byly oocyty p eneseny na podlofní sklí ko a fixovány v roztoku kyseliny octové a metanolu v pom ru 1:3 (v/v) po dobu 24 hodin. Poté byly obarveny 1 % orceinem. Následn bylo hodnoceno stádium jaderného zrání pod fázovým mikroskopem.

Analýza imunocytochemického barvení

Vzorky byly vyhodnoceny ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR v Praze 4 na oddělení Biomatematicky prostřednictvím laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo). Emisní vlnová délka 520 nm byla určena pro fluorescenci FITC. U všech testovacích skupin byla míra laseru konfigurována stejně. Fluorescence barviva DAPI byla určena při emisní vlnové délce 410 nm.

Statistická analýza

Míra aktivace u každé koncentrace inhibitoru kalcineurinu byla srovnána pomocí χ^2 testu v porovnání s kontrolní skupinou oocytů. *P*-hodnota nižší než 0,05, byla považována za statisticky významnou.

4.3 Experimentální schéma

4.3.1 Experiment 1

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit přítomnost obou podjednotek kalcineurinu (kalcineurin A a B) ve zralých a v partenogeneticky aktivovaných oocytech prasete pomocí buněčné lokalizace. Oocyty po *in vitro* zrání byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk a byly rozděleny do dvou skupin. První skupina oocytů se ihned imunocytochemicky obarvila (MII skupina). Druhá skupina (PA skupina) byla aktivovaná 25 nM kalcium ionoforem A23187 po dobu 5 minut. Oocyty v této experimentální skupině byly po aktivaci třikrát promyty v médiu bez kalcium ionoforu a hormonů, a byly inkubovány po dobu 18 hodin.

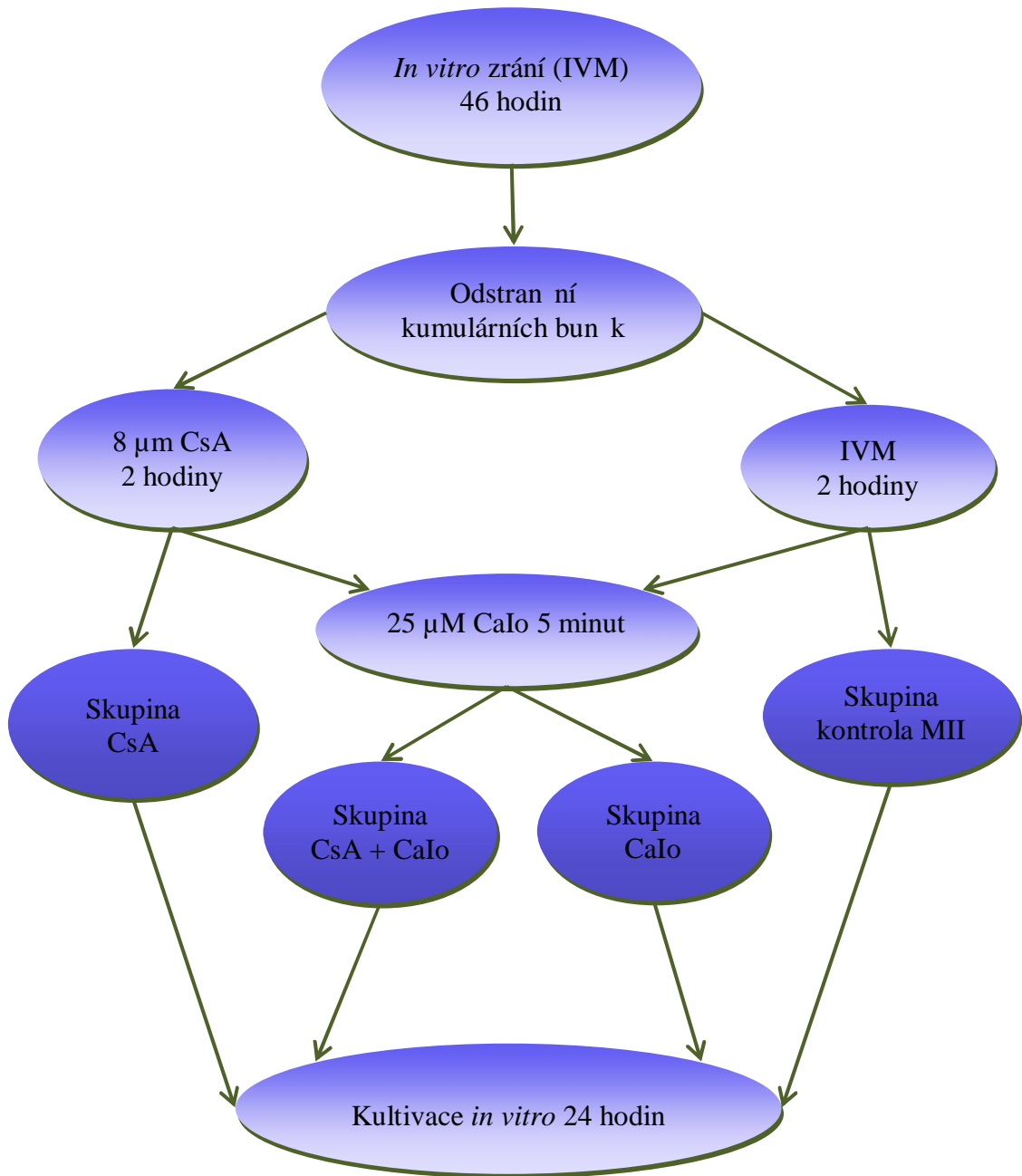
Tento experiment byl zopakován nejméně čtyřikrát.

4.3.2 Experiment 2

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv inhibice kalcineurinu a hem aktivace praseích oocytů. Po 46 hodinách *in vitro* zrání byly oocyty mechanicky zbaveny kumulárních buněk a polovina oocytů byla inkubována 2 hodiny v médiu, ve kterém bylo obsaženo 8 M cyklosporinu A (CsA skupina). Druhá polovina byla inkubována bez cyklosporinu (kontrolní skupina). Po inkubaci s cyklosporinem byla skupina aktivována působením kalcium ionoforem A23187 při koncentraci 25 M po dobu 5 minut (CsA + CaIo skupina). Polovina oocytů, která nebyla vystavena působení cyklosporinu, byla ošetřena kalcium ionoforem A23187 (CaIo skupina), jako pozitivní kontrola aktivace. Po aktivaci byly oocyty promyty a inkubovány s 0 nebo 2 M CsA po dobu 24 hodin do stádia prvojader. Všechny oocyty ze všech experimentálních skupin byly inkubovány po stejnou dobu. Po inkubaci byly oocyty fixovány a barveny a následně byla vyhodnocena jejich míra aktivace.

Tento experiment byl zopakován nejméně čtyřikrát.

Obrázek 9: Schéma experimentu



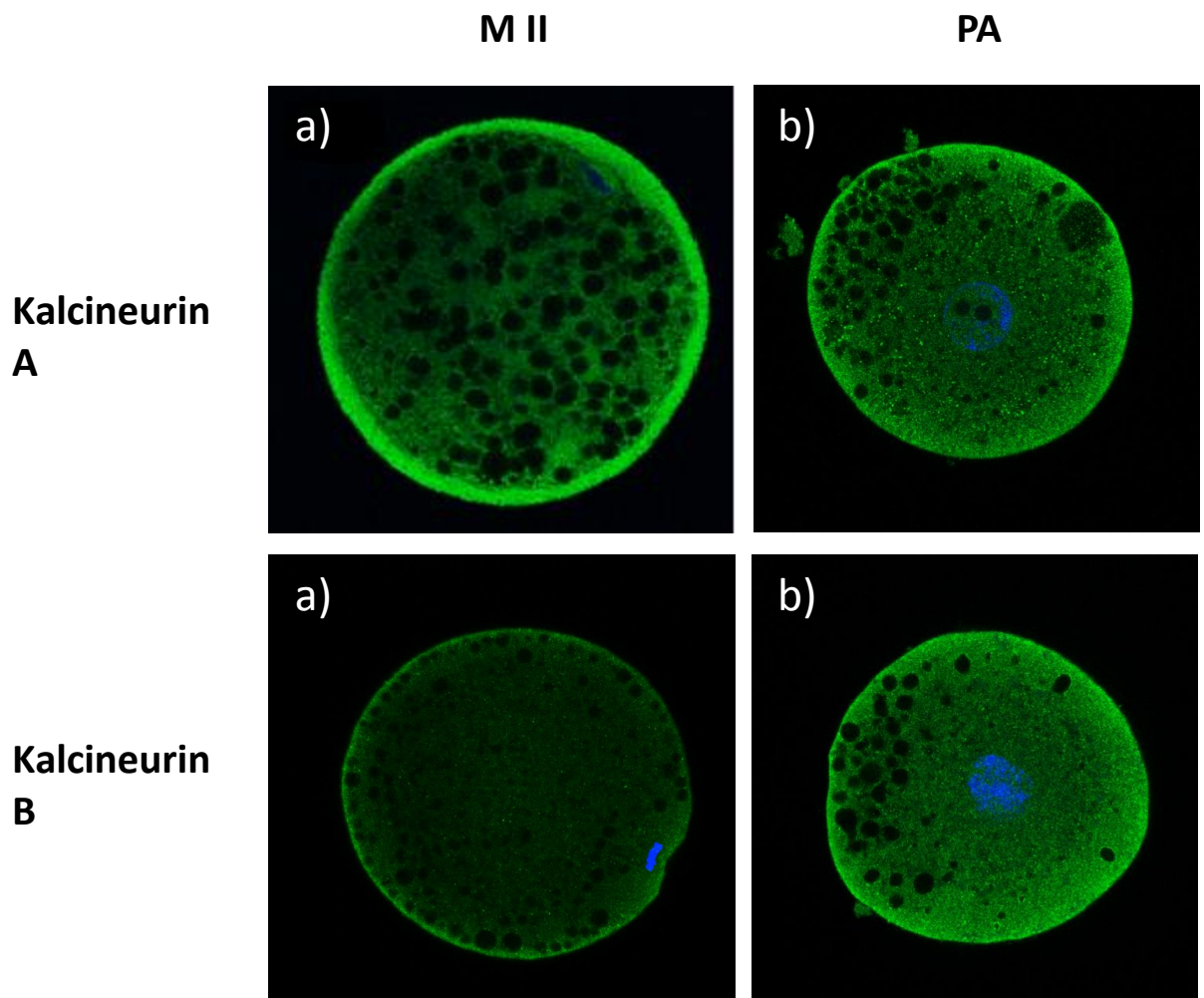
5 Výsledky

5.1 Experiment 1: Lokalizace kalcineurinu v *in vitro* zralých a partenogeneticky aktivovaných oocytech

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit přítomnost obou podjednotek kalcineurinu, kalcineurin A a kalcineurin B, během zrání prasečích oocytů a v partenogeneticky aktivovaných oocytech pomocí nepřímé imunofluorescence.

Imunocytochemické hodnocení ukázalo přítomnost obou podjednotek kalcineurinu. V oocytech nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení byl kalcineurin A i B lokalizován hlavně v korové oblasti (obrázek 10a). Kalcineurin, hlavně pak podjednotka A, byla také pozorována v oblasti cytoplazmy, zejména v oblasti dílčího vřeténka.

Obrázek 10: Lokalizace kalcineurinu v *in vitro* zralých a partenogeneticky aktivovaných oocytech prasete



Proteiny kalcineurin A a B byly lokalizovány pomocí nepřímé imunofluorescence antikalcineurinových protilátek v prasčíh oocytech po in vitro zrání (a), v partenogeneticky aktivovaných prasčíh oocyt (b). Zelen je zna en protein pomocí FITC, mod e ozna en chromatin DAPI barvivem. 400x zv t-ené.

5.2 Experiment 2: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivaci prase ích oocyt

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda inhibice kalcineurinu, inhibitorem cyklosporinem A, brání výstupu z metafáze druhého meiotického dělení, tedy dokončení meiózy a tvorbu prvojádra. U zralých oocyt, které byly partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A23187 a kultivovány 24 hodin v *in vitro* podmínkách do formování prvojader, byla úspěšnost aktivace více jak 80 % (Tabulka 5). Po ošetření oocyt inhibitorem kalcineurinu během aktivace oocyt se procento aktivace výrazně snížilo.

Tabulka 3: Výsledky aktivace *in vitro* zralých prase ích oocyt po ošetření cyklosporinem A a kalcium ionoforem

Skupina	CsA koncentrace po aktivaci(μM)	N	Úspěšnost aktivace (%)
CsA + Ca-Io	2	120	25.0 ± 3.7 ^a
CsA + Ca-Io	0	200	23.5 ± 2.8 ^a
CsA	0	44	11.4 ± 2.0 ^a
Ca-Io	0	297	83.3 ± 2.4 ^c
Kontrola M II	0	95	0 ^a

CsA= cyklosporin A, Ca-Io= kalcium ionofor A23187, MII= oocyt v metafázi II, N= počet hodnocených oocyt.

Oocyty byly ošetřeny cyklosporinem A, nebo kalcium ionoforem A23187. Za úspěšnou aktivaci bylo považován vznik prvojader. Data jsou prezentována v průměrech ± směrodatná odchylka. Horní index^{a, b, c} znázorňuje rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).

6 Diskuze

V této práci bylo prokázáno zapojení kalcium-dependentní protein fosfatázy 2B, kalcineurinu, do procesu aktivace praseího oocyty. Pomocí imunocytochemické metody byly lokalizovány obě podjednotky kalcineurinu, jak katalytická A, tak regulační B podjednotka. Obě podjednotky byly detekovány v oocytech jak na konci jejich meiotického zrání, ve stádiu druhé meiotické metafáze, tak v oocytech partenogeneticky aktivovaných kalcium ionoforem. U prasete byla doposud zaznamenána přítomnost kalcineurinu jen u rostoucích a zrajících oocyt (TMOVÁ *et al.*, 2013), kde bylo také potvrzeno zapojení kalcineurinu do regulace meiotického zrání (PETR *et al.*, 2013). V procesu aktivace byla úloha kalcineurinu zatím prokázána jen u oocyt mouchy rodu *Drosophila* (Krauchunas *et al.*, 2013) a fláby rodu *Xenopus* (Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007), kde je kalcineurin zapojen do regulace meiózy, resp. výstupu z metafáze II. Výsledky této práce naznačují, že oocyt savců mohou být kalcineurinem regulovány obdobným způsobem jako u *Drosophily* a *Xenopa*. Po partenogenetické aktivaci byly v naší studii lokalizovány obě podjednotky kalcineurinu, A i B, a to i v prvojádrech zygot. Silný signál fluorescence jsme zaznamenali také v okolí prvojader, a to zejména v případě kalcineurinu A. Tato lokalizace kalcineurinu může souviset se skutečností, že se v okolí prvojader nachází síť mikrotubul, která je důležitá pro migraci prvojader do středu vajíčka (Schatten, 1994). Je známo, že kalcineurin má silný vliv na fosforylaci slovek cytoskeletu buňky (Silverman-Gavrila a Charlton, 2009). Lze se proto domnívat, že by v savčích zygotách mohl být kalcineurin zapojen do organizace mikrotubulární sítě důležité pro migraci prvojader.

Pokud byl kalcineurin inhibován cyklosporinem A před aktivací oocyty prasete, byla zaznamenána snížená míra aktivace oocyty. Stejný účinek inhibice kalcineurinu byl pozorován i při aktivaci oocyt *Xenopa* (Nishiyama *et al.*, 2007), což dokládá, že kalcineurin je nezbytný pro výstup z druhého meiotického bloku. Bylo potvrzeno, že pro přechod z metafáze do anafáze druhého meiotického dělení je u *Xenopa* nutná aktivita APC/C (Taieb *et al.*, 2001). Nedávná studie Feine *et al.* (2014) ukázala, že kalcineurin při procesu oplození *Xenopa* aktivuje APC/C a způsobuje degradaci kinázy Aurora borealis, Bora, protože defosforyluje Thr52, což následně vede k inaktivaci CDK a Plk1. Zda je kalcineurin v oocyty prasete zapojen do signalizace stejným způsobem, zůstává zatím nejasné. Možnost jiných alternativních cílových systémů by naznačovala i skutečnost, že v oocytech *Xenopa* sice inhibice kalcineurinu potlačuje vliv defosforylace cdc20, ale inaktivace MPF degradací cyklinu B je pouze omezená, nikoliv kompletně inhibována (Mochida *et al.*, 2007).

V korové oblasti prasečích oocytů nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení byl pozorován výšší signál fluorescence obou podjednotek kalcineurinu. Je možné, že je kalcineurin zapojen do procesu exocytózy CG. Po partenogenetické aktivaci nebyla však zaznamenána změna v signálu fluorescence kalcineurinu. Proto lze předpokládat, že kalcineurin není obsažen v kortikálních granulích, ale nachází se v jejich okolí pod oolemou.

Podíl kalcineurinu na exocytóze kortikálních granul by tak mohl souviset s aktivitou aktinových filament, jimiž jsou kortikální granula uchycena pod oolemou (Longo a Chen, 1985). Fúze kortikálních granul s oolemou je kalcium dependentní proces, do kterého je zapojena i regulační molekula kalmodulin (Ducibella, 1996). Oscilace intracelulárního vápníku aktivují na přechodnou dobu kalcium/kalmodulin dependentní kinázu II (CaMKII) a kalcineurin (Nishiyama *et al.*, 2007). Oba tyto proteiny jsou pravděpodobně zapojeny do exocytózy kortikálních granul (Abbot a Ducibella, 2001; Nishiyama *et al.*, 2007), ale jsou aktivovány nezávisle (Nishiyama *et al.*, 2007). Je známo, že během exocytózy kortikálních granul dochází k jejich přesunu směrem k oolem pomocí zkracování a depolymerizace aktinových filament (Ducibella, 1996), přičemž do defosforylace aktinu je zapojen pravděpodobně i kalcineurin (Silverman-Gavrila a Charlton, 2009).

Na základě výsledků je zřejmé, že protein fosfatáza 2B je přítomna v oocytech prasete a je zapojena do procesu tvorby prvojader po partenogenetické aktivaci. Pro lepší pochopení úlohy kalcineurinu v jednotlivých dějích aktivace je nezbytné pokračovat v dalších experimentech.

7 Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda je protein fosfatáza 2B, kalcineurin, zapojena do aktivace praseích oocytů. Hypotéza byla ověřena inhibicí kalcineurinu cyklosporinem A během aktivace praseích oocytů.

Pomocí nepřímé imunofluorescence byla prokázána přítomnost obou podjednotek kalcineurinu. Lokalizace kalcineurinu byla sledována ve třech oblastech: oblast prvojádra, případně oblast dílčího vstříčku, korová oblast a oblast cytoplazmy. V oocytech MII a v partenogeneticky aktivovaných oocytech kalcineurin A i B lokalizován zejména v korové oblasti. Podjednotka A byla lokalizována v cytoplazmě v okolí prvojader.

Inhibice kalcineurinu během aktivace oocytu způsobila statisticky významné snížení míry aktivace a tvorby prvojader. Z toho lze usuzovat, že se kalcineurin podílí na aktivaci praseích oocytů. Jakým způsobem je kalcineurin zapojen do procesu aktivace oocytu a které signální dráhy ovlivňuje, není zatím známo. Pro přesnější určení jeho role v aktivaci bude zapotřebí dalších experimentů.

8 Seznam literatury

- Abeydeera, L. R. 2002.** In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57. 2576-273.
- Abbott, A. L., Ducibella, T. 2001.** Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience*. 6. 792-806.
- Alexandrescu, I. C., Lawson, D. M. 2003.** Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. 228. 596-603.
- Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. 2001.** Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *The International Journal of Developmental Biology*. 45. p. 797-809.
- Antosik, P., Kempisty, B., Bukowska, D., Jackowska, M., Wlodarczyk, R., Budna, J., Brüssow, K. P., Lianeri, M., Jagodzinski, P. P., Jakowski, J. M. 2009.** Follicular Size is Associated with the Levels of Transcripts and Proteins of Selected Molecules Responsible for the Fertilization Ability of Oocytes of Puberal Gilts. *Journal of Reproduction and Development*, 55 (6). 588-593.
- Appelant, R., Beek, J., Vandenberghe, L., Maes, D., Soom, A. V. 2015.** Increasing the cAMP concentration during *in vitro* maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization *in vitro*. *Theriogenology*. 83. 344-352.
- Backs, J., Stein, P., Backs, T., Duncan, F. E., Grueter, C. E., McAnally, J., Qi, X., Schultz, R. M., Olson, E. N. 2009.** The δ isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption. *PNAS*. 107 (1). 81-86.
- Ben-Aharon, I., Haim, K., Shalgi, R., Ben-Yosef, D. 2005.** Expression and possible involvement of calpain isoforms in mammalian egg activation. *Reproduction*. 130. 165-175.
- Bennett, J. C., Roggero, C. M., Mancifesta, F. E., Mayorga L. S. 2010.** Calcineurin-mediated Dephosphorylation of Synaptotagmin VI Is Necessary for Acrosomal Exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (34). 26269-26278.
- Ben-Yosef, D., Shalgi, R. 1998.** Early ionic events in activation of the mammalian egg. *Reviews of Reproduction* 3, 96-103.

- Bing, Y., Che, L., Hirao, Y., Takenouchi, N., Rodriguez-Martinez, H., Nagai, T. 2003.** Partenogenetic Activation and Subsequent Development of Porcine Oocytes Activated by a Combined Electric Pulse and Butyrolactone I Treatment. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). p. 159-166.
- Brevini, T. A. L., Vassena, R., Francisci, C., Gandolfi, F. 2005.** Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. *Biology of reproduction*. 72. 1218-1223.
- Cella, M., Farina, M. G., Sarmiento, M. I. K., Chianelli, M., Rosenstein, R., E., Franchi, A. M. 2006.** Heme oxygenase-carbon monoxide (HO-CO) system in rat uterus: Effect of sexual steroids and prostaglandins. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 99. 59-66.
- Ciu, W., Zhang, J., Lian, H. Y., Wang, H. L., Miao, D. Q., Zhang, C. X., Luo, M. J., Tan, J. H. 2012.** Roles of MAPK and Spindle Assembly Checkpoint in Spontaneous Activation and MII Arrest of Rat Oocytes. *PLoS ONE*. 7 (2). 1611.
- Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. 2013.** Oogenesis. Springer-Verlag. London. p. 353. ISBN: 978-085729-825-6.
- Ducibella, T. 1996.** The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*, 2 (1), 29-42.
- Ellerbrock, P., Armanino, N., Trauner, D. 2014.** Biomimetic Synthesis of the Calcineurin Phosphatase Inhibitor Dibefurin. *Angewandte Chemie International Edition*. 53. 13414-13418.
- Extavour, C. 2009.** Oogenesis: Making the Most of Meiosis. *Current Biology*. 19 (12). 489-491.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004.** Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*. 70. 535-547.
- Feine, O., Hukasova, E., Bruinsma, W., Freire, R., Fainsod, A., Gannon, J., Mahbubani, H., Lindqvist, A., Brandeis, M. 2014.** Phosphorylation-mediated stabilization of Bora in mitosis coordinates Plx1/Plk1 and Cdk1 oscillation. *Cell Cycle*. 13 (11).

- Florman H. M., Ducibella, T. 2006.** Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Elsevier. ISBN: 0125154011.
- Fraga, D., Sehring, I. M., Kissmehl, R., Reiss, M., Gaines, R., Hinrichsen, R., Plattner, H. 2010.** Protein Phosphatase 2B (PP2B, Calcineurin) in *Paramecium*: Partial Characterization Reveals That Two Members of the Unusually Large Catalytic Subunit Family Have Distinct Roles in Calcium-Dependent Processes. *Eukaryotic Cell*. 9 (7). 10496-1063.
- Fulka, J. 2007.** Sav í oocyt ó nový pohled na staré dogma. *fliva*. 2007 (4). 1486150.
- Gheorghisan-Galateanu A. A, Hinescu, M. E., Enciu A. M. 2014.** Ovarian adult stem cells: hope or pitfall?. *Journal of Ovarian Research*. 7 (71). 168.
- Hämäläinen, M., Korhonem, R., Moilanen, E.,** Calcineurin inhibitors down-regulate iNOS expression by destabilising mRNA. *International Immunopharmacology*. 9. 1596167.
- Heytens, E., Soleimani, R., Sutter, D. P. 2008.** Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 6 (4). 1716174.
- Hunter, M. G. 2000.** Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 1226130.
- Hurk, R., Zhao, J. 2005.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 171761751.
- Hyslop, L. A., Nixon, V. L., Levasseur, M., Chapman, F., Chiba, K., McDougall, A., Venables, J. P., Elliott, D. J., Jones, K. T. 2004.** Ca²⁺-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Developmental Biology*. 269. 2066219.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47 (1). 23632.
- Che, L., Lalonde, A., Bordignon, V. 2007.** Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. *Theriogenology*. 67. 129761304
- Ito, J., Kawano, N., Hirabayashi, M., Shimada, M. 2004.** The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34^{cdc2} kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction*. 128. 4096415.

- Ito, J., Shimada, M., Hochi, S., Hirabayashi, M. 2007.** Involvement of Ca²⁺-dependent proteasome in the degradation of both cyclin B1 and Mos during spontaneous activation of matured rat oocytes. *Theriogenology*. 67.4756485.
- Jelínek, R., Dostál, M., Likovský, Z., Hala-ková, M., Ma áková, E., Peterka, M., Peterková, R., Titlbach, M., Velický, J., Zemanová, Z.** *Histologie embryologie*. p. 224. [online]. 2002. [cit. 2014-05-28]. Dostupné z <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/histologie/doc/Skripta_00.pdf>.
- Jessus, C., Haccard, O. 2007.** Calcium'sdouble punch. *Nature*. 449. 2976298.
- Jones, K. T. 2005.** Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130. 8136823
- Kanitz, W., Brüßow K.-P., Becker, F., Torner, H., Schneider, F., Kubelka, M., Tomek, W. 2001.** Comparative Aspects of Follicular Development, Follicular and Oocyte Maturation and Ovulation in Cattle and Pigs. *Arch. Tierz.*, 44, 9623.
- Klee, C. B., Ren, H., Wang, X., 1998.** Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase Calcineurin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (22). 13367613370.
- Krauchunas, A. R., Sackton, K. L., Wolfner, M. F. 2013.** Phospho-Regulation Pathways During Egg Activation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 195. 1716108.
- Krejčova, T., Smelcova, M., Petr, J., Bodart, J. F., Sedmikova, M., Nevorál, J., Dvorakova, M., Vyskocilova, A., Kucerova-Chrpova, V., Chmelikova, E., Tumova, L., Jilek, F. 2015.** Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. *PLOS One*. 1617.
- Laurincik, J., Ratj, D., Niemann, H., 1994.** Differences in pronucleus formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102. 2776284.
- Lee, J. I., Mukherjee, S. Yoon, K. H., Dwivedr, M., Bandyopadhyay, J., 2013.** The multiple faces of calcineurin signaling in *Caenorhabditis elegans*: Development, behaviour and aging. *J. Biosci.* 38 (2). 4176431.
- Liu, L., Ju, J. CH. Yang, X. 1998.** Differential Inactivation of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Following Partenogenetic Activation of Bovine Oocytes. *Biology of reproduction*. 59. 5376545.

- Li, S., Sun, N. 2005.** Regulation of intracellular Ca^{2+} and calcineurin by NO/PKG in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. (3). 323-328.
- Li, X., Zhu, L., Yang, A., Lin, J., Tang, F., Jin, S., Wei, Z., Li, J., Jin, Y., 2011.** Calcineurin-NFAT Signaling Critically Regulates Early Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryos. *Cell Stem Cell*. 8. 466-475.
- Longo, F. J., Chen, D. Y., 1985.** Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Development Biology*, 107 (2), 382-394
- Madgwick, S., Jones, K. T. 2007.** How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division*. 2 (4). 167.
- Martin, B. L. 1998.** Inhibition of Calcineurin by the Tyrphostin Class of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 56. 483-488.
- Ma ha, V., Havlí ek, V., Havlí ková, J., Hökl, J., Jegorov, A., Klíma, J., Luká , J., Ko andrle, V., Málek, I., Matl, I., Matei ka, F., Mi eková, D., Petrásek, R., Rauová, L., Rovenský, J., Satke, J., Saudek, F., Sedmera, P., Sechser, T., Stan íková, M., Starý, J., Studeník, P., Stuchlík, J., Stuchlík, M. 1994.** *Cyklosporin A*. Grada Publishing. Praha. p. 160. ISBN: 80-7169-134-8.
- Mayes, M. A., Stogsdill, P. L., Prather, R. S. 1995.** Parthenogenic Activation of Pig Oocytes by Protein Kinase Inhibition. *Biology of reproduction*. 53. 2706-2715.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007.** Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 336-341.
- Molyneaux, K., Wylie, C. 2004.** Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology*. 48. 537-544.
- Moreira, F., Corcini, C. D., Mondadori, R. G., Gevehr-Fernandes, C., Mendes, F. F., Aragújo, E. G., Lucia Jr. T. 2013.** Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. *Animal Reproduction Science*. 139. 89-94.
- Nader, N., Kulkarni, R. P., Dip, M., Machaca, K. 2013.** How to make a good egg! The need remodeling of oocyte Ca^{2+} signaling to mediate the egg-to-embryo transition. *Cell Calcium*. 53. 416-424.
- Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J. F., Kucerova-Chrpova, V., Sedmikova, M., Krejcova, T., Kolbabova, T., Dvorakova, M., Vyskocilova, A., Weingartova, I.,**

- Krivohlavkova, L., Zalmanova, T., Jilek, F. 2014.** Dual Effects of Hydrogen Sulfide Donor on Meiosis and Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complex. *PLOS ONE*. 9 (7). 169.
- Nevoral, J., Krejová, T., Petr, J., Melicharová, P., Vyskočilová, A., Dvořáková M., Weingartová, I., Chmelíková, E., Těmlová, L., Hořková, K., Kučerová-Chrpová, V., Sedmíková, M. 2013.** The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. *Czech Journal Animal Science*. 58 (10). 4536459.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, N., Ohsumi, K. 2007.** Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 3416345.
- Patiny, L., Guichu, J. F., Keller, M., Turpin, O., Rückle, T., Lhote, P., Buetler, T. M., Rugg, U. T., Wenger, R. M., Mutter, M. 2003.** Synthesis and characterization of constrained cyclosporin A derivatives containing a pseudo-proline group. *Tetrahedron*. 59. 524165249.
- Peers, C., Lefer, D. J. 2011.** Emerging roles for gasotransmitters. *The Physiological Society*. 96 (6). 8316832.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Těmlová, D., Jilek, F. 2005.** Activation of Pig Oocytes Using Nitric Oxide Donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71. 1156122.
- Petr, J., Rozinek, J., Jilek, F., Urbanová, D. 2000.** Activation of Porcine Oocytes Using Cyclopiazonic Acid, an Inhibitor of Calcium-Dependent ATPases. *Journal of Experimental Zoology*. 287. 3046315.
- Petr, J., Chmelíková, E., Zalmanová, T., Těmlová, L., Kheilová, K., Kučerová-Chrpová, V., Jilek, F. 2013.** Pyrethroids cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate have different effects on in vitro maturation of pig oocytes at different stages of growth. *Animal*. 7 (1). 1346142.
- Romero-Aguirregomez-corta, J., Santa, Á. P., García-Vázquez, F. A., Coy, P., Matás, C. 2014.** Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibition during Porcine In Vitro Maturation Modifies Oocyte Protein S-Nitrosylation and In Vitro Fertilization. *Plos One*. 10. 1617.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000.** Calcineurin: Form and Function. *Physiological Reviews*. 80 (4). 148361521.

- Sasseville, M., Coté, N., Vigneault, C. Guillementte, C., Richard, F. J. 2007.** 3'5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Up-Regulation of Phosphodiesterase Type 3A in porcine Cumulus Cells. *Endocrinology*. 148 (4). 185861867.
- Saunders, M. C., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. 2002.** PLC γ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129. 353363544.
- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2003.** Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. 60. 160961620.
- Schatten, G. 1994.** The Centrosome and Its Mode of Inheritance: The Reduction of the Centrosome during Gametogenesis and Its Restoration during Fertilization. *Developmental Biology*, 165 (2), 299-335.
- Schwartz, K. R. L. Pires, P. R. L., Mesquita, L. G., Chiratti, M. R., Leal, C. L. V. 2014.** Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*. 81. 5566564.
- Silverman-Gavrila, L. B., Charlton, M. P. 2009.** Calcineurin and cytoskeleton in low-frequency depression. *Journal of Neurochemistry*, 109 (3), 716-732.
- Sirard, M. A., Richard, F., Mayes, M., 1998.** Controlling meiotic resumption in bovine oocytes a review. *Theriogenology*. 49. 4836497.
- Somfai, T., Kikuchi, K., Onishi, A., Iwamoto, M., Fuchimoto, D., Papp, B. A., Sato, E., Nagai, T. 2004.** Relationship Between the Morphological Changes of Somatic Compartment and the Kinetics of Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Oocytes During In Vitro Maturation of Porcine Follicular Oocytes. *Molecular reproduction and development*. 68. 4846 491.
- Stemmer, P. M., Wang, X., Krinks, M. H., Klee, C. B. 1995.** Factors responsible for the Ca^{2+} -dependent inactivation of calcineurin in brain. *FEBS Letters*. 374. 2376240.
- Su, Y. Q., Wigglesworth, K., Pendola, F. L., O'Brien, M. J., Eppig, J. J. 2002.** Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Cumulus Cells Is Essential for Gonadotropin-Induced Oocyte Meiotic Resumption and Cumulus Expansion in the Mouse. *Endocrinology*. 143 (6). 222162232.

- Sueyoshi, N., Takao, T., Nimura, T., Sugiyama, Y., Numano, T., Shigeri, Y., Taniguchi, T., Kameshita, I., Ishida, A. 2007.** Inhibitors of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase family (CaMKP and CaMKP-N). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 363. 7156721.
- Sun, F. Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W., Moor, R. M. 1992.** A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development*. 115, 9476956.
- Susor, A., Jansova, D., Cerna, R., Danylevska, A., Anger, M., Toralova, T., Malik, R., Supolikova, J., Cook, M. S., Oh, J. S., Kubelka, M., 2015.** Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR6eIF4F pathway. *Nature COMMUNACATIONS*. 6. 1612.
- Taieb, E. F., Gross, S. D., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 2001.** Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes. *Current Biology*. 11 (7). 5086513.
- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006.** The Calcineurin regulator Sra plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*. 16. 143561440.
- Takuwa, N., Zhou, W., Takuwa, Y. 1995.** Calcium, Calmodulin and cell cycle progression. *Cellular Sagnalling*. 7 (2). 936104.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., Means, A. R. 1988.** Identification, Characterization, and Functional Correlation of Calmodulin-dependent Protein Phosphatase in Sperm. *The Journal of Cell Biology*. 106. 162561633.
- Tilly, J. L., Telfer, E. E. 2009.** Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock?. *Molecular Human Reproduction*. 15 (7). 3936398.
- Tripathi, A., Kumar, K. V. P., Chaube, S. K. 2010.** Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 223. 5926600.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Tsolova, M. 2008.** Glycobiology of fertilization in the pig. *The Internetalional Journal of Developmental Biology*. 52. 7176736.

- T mová, L., Petr, J., fialmanová, T., Chmeliková, E., Kott, T.,Tichovska, H., Ku erová-Chrpová, V., Ho-ková, K., Jílek, F. 2013.** Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science*, 141, 1546163.
- Varga, E., Pataki, R., Lörincz, Z., Koltai, J., Papp, Á. B. 2008.** Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Animal Reproduction Science*. 105. 2266233.
- Von Stetina, J. R., Orr-Weaver, T. L. 2011.** Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3. 16 19.
- Wang, R. 2014.** Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends in Biochemical Sciences*. 39 (5). 2276232.
- Wang, H. W., Macháty, Z., Abeydeera, L. R., Prather, R. S., Day, B. N. 1998.** Parthenogenetic Activation of Pig Oocytes with Calcium Ionophore and the Block to Sperm Penetration after Activation. *Biology of Reproduction*. 58. 135761366.
- Ward, C. J., Beattie, K. A., Lee, E. Y. C., Codd, G. A. 1997.** Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystin. *FEMS Microbiology Letters*. 153. 4656473.
- Wassarman, P. M. 1988.** Zona Pellucida Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry*. 57. 4156442.
- Wassarman, P. M. 1999.** Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell*. 96. 1756183.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S. 2001.** A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*. 3. 59664.
- Williams, C. J. 2002.** Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*. 8 (4). 313632.
- Yamamoto, D. S., Tachibana, K., Sumitani, M., Lee, J. M., Hatakeyama, M. 2008.** Involvement of Mos6MEK6MAPK pathway in cytotstatic factor (CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, *Athalia rosae*. *Mechanisms of Development*. 125. 99661008.

9 Seznam použitých zkratk a symbol

AC ó adenalátcykláza

APC ó anafázi podporující komplex

ATP ó adenosintrifosfát

BMP ó kostní morfologický protein

BLI ó butyrolakton I

CaMKII ó kalcium/kalmodulin dependentní kináza II

cAMP ó cyklický adenosinmonofosfát

CDK ó cyklin-dependentní kinasa

CO ó oxid uhelnatý

CPA ó kyselina cyklopianozová

CSF ó cytostatický faktor

CyA ó cyklosporin A

DAG ó 1,2-diacylglycerol

DNA ó deoxynukleová kyselina

E3 ó ubikvitin ligáza

Emi2 ó mitotický inhibitor 1-related protein, Erp1

eNOS ó ednotelová NOS

ESC ó embryonální kmenové buňky

FCS ó sérový bovinní albumin

FF ó folikulární tekutina

FSH ó folikulostimulační hormon

GnRH ó gonadotropin releasing hormon

GV ó zárodečný váček

GSC ó zárodečné kmenové buňky

GVBD ó rozpad zárodečného vakuolu

H₂S ó sirovodík

iNOS ó inducibilní NOS

IP3 ó inositoltrifosfát

IVF ó *in vitro* fertilizace

IVM ó *in vitro* zrání

LH ó luteinizační hormon

MeBmt ó typický znak v t-iny cyklosporin , (2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-oktenová kyselina
NFAT ó nukleární faktor aktivovaných T bun k
MPF ó maturaci podporující faktor
NO ó oxid dusnatý
NOS ó syntáza oxidu dusnatého
NPRC ó natriuretický peptid C
NNPC ó prekurzor natriuretického peptidu C
p34^{cdc2} ó cyklin-dependetní kináza
PDE ó fosfodiesteráza
PGC ó primordiální zárode né bu ky
PIP2 ó fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA ó proteinkináza A
PKC ó proteinkináza C
PLC ó fosfolipáza C
PLC ó fosfolipáza C zeta
RAF ó RAF-kináza, serin/threonin-specifická proteinkináza
RNA ó ribonukleová kyselina
SCF ubikvitin ligáza ó Skp1-Cull1-F-box-protein
ZP ó zona pellucida

10 Seznam obrázk

Obrázek 1: Růst folikulu, prasečího oocytu a získání meiotické kompetence (Hunter, 2000) (str. 7)

Obrázek 2: Oplození (str. 10)

Obrázek 3: Hypotetický model aktivace oocytů faktorem spermií (str. 14)

Obrázek 4: Schématické znázornění znovuoobnovení buněčného cyklu (str. 16)

Obrázek 5: Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání a oplození u myši a potkan (Fan a Sun, 2004) (str. 17)

Obrázek 6: Zjednodušené schéma řízení cAMP v buňce (Sirard *et al.*, 1998) (str. 20)

Obrázek 7: Strukturní schéma trojrozměrného kalcineurinu v komplexu s FK506-FK506 vazebným proteinem (FKBP) (str. 25)

Obrázek 8: Cyklosporin A (str. 27)

Obrázek 9: Schéma experimentu (str. 36)

Obrázek 10: Lokalizace kalcineurinu v *in vitro* zralých a partenogeneticky aktivovaných oocytech prasete (str. 38)

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Faktory ovlivňující vznik primordiálních zárodečných buněk (Hurk a Zhao, 2005)

(str. 4)

Tabulka 2: Poměr složek obohacující médium M199 pro *in vitro* zrání prasečích oocyt

(str. 32)

Tabulka 3: Výsledky aktivace *in vitro* zralých prasečích oocyt po ošetření cyklosporinem A

a kalcium ionoforem (str. 39)